

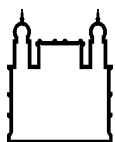
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

VIGILÂNCIA DOS SEROTIPOS E GENÓTIPOS DO VÍRUS DA
DENGUE CIRCULANTE NO NORTE DE MOÇAMBIQUE ENTRE OS
ANOS DE 2014 A 2016

ISABEL JÚLIO MAHUMANE GUNDANE

Maputo
Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ISABEL JÚLIO MAHUMANE GUNDANE

Vigilância dos Serotipos e Genótipos do Vírus da Dengue Circulantes no Norte de Moçambique Entre os Anos de 2014 a 2016

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Parasitária

Orientadores: Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo Júnior
Prof^a. Dr^a. Flavia Barreto dos Santos

Co-orientadora: Dr^a. Fernanda de Bruycker Nogueira

Maputo
Julho de 2017

Gundane, Isabel Júlio Mahumane.

Vigilância dos serotipos e genótipos do vírus da dengue circulante no norte de Moçambique entre os anos de 2014 a 2016 / Isabel Júlio Mahumane Gundane. - Maputo, 2017.

70 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: Eduardo Samo Gudo Júnior.

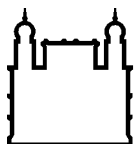
Co-orientadora: Flávia Barreto dos Santos.

Co-orientadora: Fernanda de Bruycker Nogueira.

Bibliografia: f. 58-70

1. Dengue. 2. Serotipos. 3. genótipos. 4. Moçambique. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde

ISABEL JÚLIO MAHUMANE GUNDANE

**VIGILÂNCIA DOS SEROTIPOS E GENÓTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE
CIRCULANTES NO NORTE DE MOÇAMBIQUE ENTRE OS ANOS DE 2014 A
2016**

**Orientadores: Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo Júnior
Prof^a. Dr^a. Flavia Barreto dos Santos**

Co-orientadora: Dr^a. Fernanda de Bruycker Nogueira

Aprovada em: 12/07/2017

**EXAMINADORES: Dr. Wilson Savino - Presidente (Fundação Oswaldo Cruz)
Prof. Dr. José Fafetine (Universidade Eduardo Mondlane)
Prof. Dr. Rosely de Oliveira (Fundação Oswaldo Cruz)**

Maputo, Julho de 2017

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus Pais Júlio Mahumane (em memória) e Maria Machel;

Ao meu Amável e Atencioso Esposo Fidélis Gundane;

Ao meu Amável Filho Fidélis Gundane Jr.

Agradecimentos

Em primeiro lugar á Deus pela infinita misericórdia, por me ter dado a clarividência e forças para realizar o presente trabalho. A ele toda Honra, Glória e Louvor.

Aos meus orientadores: Dr. Eduardo Samo Gudo Jr. e Dra. Flávia Barreto dos Santos (Quériða), pela sábia passagem de conhecimentos, pelo apoio desde a concepção e execução da presente dissertação, pela atenção com cada detalhe, pela paciência, amizade e críticas construtivas.

Fernanda B. Nogueira, não tem como não manifestar minha eterna gratidão pela paciência em ensinar-me detalhadamente tudo que sei hoje sobre epidemiologia molecular (desde a teoria á prática) e acima de tudo pela prontidão para responder as minha dificuldades e apoio na preparação da dissertação.

A toda família do Laboratório de Flavivírus, FIOCRUZ-Brasil pela recepção e hospitalidade (me senti parte da família), com especial atenção para Dra. Ana Bispo, Dra. Nieli Faria e Thiara Manuele.

As equipes do Hospital Provincial de Pemba e Hospital Central de Nampula pelo apoio com a identificação e reporte dos casos suspeitos e referenciamento de amostras.

A coordenação do Curso de Mestrado em Ciências de Saúde (Instituto Nacional de Saúde e Fundação Oswaldo Cruz) pela oportunidade.

A Dra. Nilsa de Deus pelo apoio, paciência e compreensão.

Agradeço também aos meus colegas do Instituto Nacional de Saúde, especialmente aos colegas do Laboratório de Virologia Molecular e do Isolamento Viral.

Quero manifestar os meus mais profundos agradecimentos a Mana Nádia, Sádía,

Adolfo, Nédio, Ana Flora, Nália, Deonilde, Gabriela, Almiro e Tatiana por toda atenção e apoio, valiosas foram as vossas contribuições.

Aos colegas da quarta turma de Mestrado em Ciências de Saúde pelo apoio e companheirismo.

Aos meus Pais Júlio Mahumane (em memória) e Maria Machel, meus eternos líderes. Cada passo meu é um sinal de que guardo e sigo cada ensinamento por vós transmitido.

As minhas mais que irmãs (Joana, Zulmira, Julieta e Ana), cunhados e sobrinhos pelas orações, amor e carinho.

Aos meus sogros Francisco Gundane e Graça Matola pelas orações, atenção, amor, e compreensão em cada ausência.

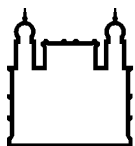
Aos meus mais que cunhados (Jorino, Inocência, Rosalina, Deodita, Quinfraine, Binilde, Candinha, Micael e Joana), pela rapidez em atender ao meu chamado, pela simplicidade e acima de tudo por me apoiar sempre que precisei estar ausente e pelo amor que têm pela nossa família.

Agradecimentos especiais vão para meu esposo (Fidélix Gundane) e meu filho (Fidélix Gundane Jr.) meus Fs, por entenderem cada ausência e cada "agora não posso", a vocês todo o meu amor.

A todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Descobri que há uma harmonia maravilhosa nas verdades complementares da fé e da ciência. O Deus da Bíblia é também o Deus do genoma. Deus pode ser encontrado na catedral e no laboratório. Investigando a criação incível e majestosa de Deus, a ciência pode na verdade ser uma forma de louvor".

Francis Collins



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

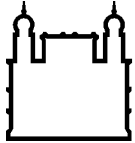
VIGILÂNCIA DOS SEROTIPOS E GENÓTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE CIRCULANTE EM MOÇAMBIQUE ENTRE OS ANOS DE 2014 A 2016

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Isabel Júlio Mahumane Gundane

A Dengue é uma importante e prevalente arbovirose que acomete o homem no mundo, transmitida através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*. Quatro serotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a 4) podem causar tanto a dengue com ou sem sinais de alerta, quanto a dengue grave. Cerca de 2.5 bilhões de pessoas vivem em países de risco para ocorrência da dengue, e Moçambique está entre eles, com histórico de casos da doença pelo serotipo 3 entre os anos de 1984 e 1985, sendo o primeiro relato deste serotipo em África. Cerca de 30 anos após o primeiro reporte de casos, novos casos de dengue tem sido notificados desde 2014 em Cabo Delgado e Nampula (Províncias do Norte de Moçambique). Com o objectivo de monitorar os serotipos e identificar os genótipos dos DENV envolvidos nos casos de doença registados entre 2014-2016 em Moçambique, foram seleccionadas 64 amostras colhidas nos anos de 2014 e 2015, com resultado positivo confirmado pelos testes serológicos e/ou RT-PCR e 18 amostras colhidas em 2016 com resultado positivo em testes serológicos. O DENV-2 foi o único serotipo identificado e 8 amostras foram sequenciadas (3 de 2014, 3 de 2015 e 2 de 2016), baseando-se na sequência de nucleotídeos correspondente a junção dos genes E/NS1 (240pb) e submetidas à análise filogenética. A análise filogenética permitiu a identificação do genótipo Cosmopolita em Moçambique. As nossas sequências agruparam-se com as sequências provenientes da Tanzânia e países Asiáticos (China, Vietname e Indonésia), sugerindo uma troca dos vírus entre esses países, destacando-se assim a necessidade de estudos epidemiológicos que incluam análises moleculares dos vírus, uma vez que estes constituem uma ferramenta importante para monitoria da introdução, evolução e dispersão dos vírus, assim como para prever consequências epidemiológicas durante períodos epidêmicos e interepidêmicos.



Ministério da Saúde

FIUCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

SURVEILLANCE OF DENGUE VIRUS SEROTYPES AND GENOTYPES IN MOZAMBIQUE BETWEEN 2014 AND 2016

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITIC BIOLOGY

Isabel Júlio Mahumane Gundane

Dengue is an important and prevalent arboviruses that affects the human in the world, transmitted by the biting of mosquitoes of the genus *Aedes*. Four antigenically distinct serotypes (DENV-1 to 4) can cause both dengue with or without warning signs and severe dengue. About 2.5 billion people live in countries at risk for dengue, and Mozambique is among them, with a history of cases of the disease by serotype 3 between 1984 and 1985, being the first report of this serotype in Africa. About 30 years after the first case report, new cases of dengue have been reported since 2014 in Cabo Delgado and Nampula (Northern Provinces of Mozambique). In order to monitor the serotypes and to identify the DENV genotypes involved in cases of disease recorded between 2014-2016 in Mozambique, we selected 64 samples collected in the years 2014 and 2015, with a positive result confirmed by serological tests and / or RT-PCR and 18 samples collected in 2016 with positive result in serological tests. DENV-2 was the only serotype identified and 8 samples were sequenced (3 of 2014, 3 of 2015 and 2 of 2016), based on the nucleotide sequence corresponding to E / NS1 (240pb) gene junction and submitted to phylogenetic analysis. Phylogenetic analysis allowed the identification of the Cosmopolitan genotype in Mozambique. Our sequences were grouped with sequences from Tanzania and Asian countries (China, Vietnam and Indonesia), suggesting a change of viruses between these countries, thus highlighting the need for epidemiological studies that include molecular analyzes of the virus once that these are an important tool for monitoring the introduction, evolution and spread of viruses, as well as for predicting epidemiological consequences during epidemic and interepidemic periods.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dengue	1
1.2. Histórico	2
1.3. Ciclo de transmissão do vírus	4
1.4. Morfologia e estrutura do vírus	6
1.4.1. Proteínas estruturais e não estruturais.....	8
1.5. Classificação e diversidade genética dos DENV	11
1.6. Replicação viral	14
1.7. Manifestações clínicas e classificação da dengue	15
1.8. Diagnóstico laboratorial	17
1.9. Patogênese da infecção pelo DENV	18
1.10. Epidemiologia da dengue no mundo	21
1.10.1. Dengue na África	23
1.10.2. Dengue em Moçambique	25
1.11. JUSTIFICATIVA	26
2. OBJECTIVOS.....	28
2.1. Objectivo Geral	28
2.2. Objectivos Específicos	28
3. Material e Métodos.....	29
3.1. Considerações éticas	29
3.2. Desenho e área do estudo.....	29
3.3. Definição de Caso	30
3.4. Preparação e transporte de amostras	31
3.5. Determinação de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA).....	32
3.6. Determinação de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA)	32
3.7. Determinação de antígenos NS1 (Ag-ELISA)	32
3.8. Extração do RNA viral	32
3.9. Reacção em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)	33
3.10. RT-PCR para serotipagem	36
3.11. RT-PCR para sequenciamento genómico	37
3.12. Purificação e quantificação do DNA.....	39
3.13. Reacção de sequenciamento.....	39
3.14. Análise filogenética	39
3.15. Sequências do Genbank para estudos comparativos e análise filogenética .	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Características gerais dos casos de Dengue identificados durante o surto e no período de vigilância pós-surto	42
4.2. Serotipagem do DENV em pacientes com infecção confirmada.....	46

4.4. Genotipagem de DENV	48
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÃO.....	56
7. RECOMENDAÇÕES.....	57
8. LIMITAÇÕES.....	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo dos ciclos de transmissão silvestre e urbano dos vírus da Dengue.....	5
Figura 2: Representação da estrutura dos flavivírus.....	7
Figura 3: Esquema organizacional do genoma viral do DENV.....	8
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de replicação dos DENV.....	15
Figura 5: Classificação da dengue proposta pela OMS, 2009.....	16
Figura 6: Período estimado da infecção pelo DENV em dias e os alvos dos métodos diagnósticos que podem ser usados para detectar a infecção.....	18
Figura 7: Factores de risco para ocorrência da dengue grave.....	21
Figura 8: Número médio de casos de dengue suspeitos ou confirmados reportados a OMS entre 2010-2016.....	22
Figura 9: Locais de ocorrência do surto de dengue registado em Moçambique no ano de 2014.....	30
Figura 10: Número de casos suspeitos identificados durante as investigações de surto (2014) e pós surto (2015 e 2016).....	31
Figura 11: Fluxograma de testagem das amostras colhidas em 2014 (investigação do surto de dengue em Moçambique).....	34
Figura 12: Fluxograma de testagem das amostras colhidas em 2015 (investigação pós-surto de dengue em Moçambique).....	35

Figura 13: Fluxograma de testagem das amostras colhidas em 2016 (investigação pós surto de dengue em Moçambique).....	36
Figura 14: Representação gráfica da monitoria anual dos casos suspeitos de infecção pelo DENV.....	47
Figura 15: Electroforese em gel de agarose 1.5% dos produtos amplificados por RT-PCR (Lanciotti <i>et al.</i> , 1992).....	48
Figura 16: Árvore filogenética baseada na análise de sequências da junção dos genes E/NS1 do DENV-2.....	50
Figura 17: Representação gráfica da identificação de casos suspeitos por mês e por ano.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos genótipos dos DENV baseada na análise filogenética das sequências do gene do envelope.....	13
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-PCR para a serotipagem dos DENV.....	37
Tabela 3: Reagentes utilizados na transcrição RT-PCR para amplificação do gene E/NS1 dos DENV 2.....	38
Tabela 4: Descrição das sequências de referência obtidas no genbank para análise filogenética.....	40
Tabela 5: Informações dos casos suspeitos de infecção pelos DENV identificados em 2015 durante a vigilância pós-surto de dengue em Moçambique.....	44
Tabela 6: Informações dos casos suspeitos identificados em 2016 durante a vigilância após o surto de Dengue em Moçambique.....	46
Tabela 7: Descrição das amostras sequenciadas para genotipagem do DENV. Amostras colhidas entre 2014 a 2015 em Moçambique.....	49
Tabela 8: Sequência nucleotídica da junção E/NS1 dos DENV-2 do ano de 2015 depositadas no Genbank.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Célcius
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
µl	Microlitros
nm	Nanômetros
ABI	<i>Applied Biosystems</i>
AD	Anno Domini
ADE	<i>Antibody Dependent Enhancement</i>
C	Proteína Estrutural do Capsídeo do Vírus
CDC	Centro de Controlo e Prevenção de Doenças
cDNA	Ácido Desoxiribonucleico Complementar
CIOMS	<i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i>
CNBS	Comité Nacional de Bioética em Saúde
DC	Dengue Clássica
DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Vírus Dengue Serotipo 1
DENV-2	Vírus Dengue Serotipo 2
DENV-3	Vírus Dengue Serotipo 3
DENV-4	Vírus Dengue Serotipo 4
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
E	Proteína Estrutural do Envelope do Vírus
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-acético
E/NS1	Proteína Estrutural do Envelope/ Proteína não Estrutural 1
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCN	Hospital Central de Nampula
HPP	Hospital Provincial de Pemba
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Imunoglobulina da Classe G

IL	Interleucina
INE	Instituto Nacional de Estatística
IgM	Imunoglobulina da Classe M
INFγ	Interferon gama
INS	Instituto Nacional de Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LIV	Laboratório de Isolamento Viral
M	Proteína Estrutural da Membrana
MAC-ELISA	Ensaio Imunoenzimático para Detecção de Anticorpos IgM
NICD	<i>National Institute for Communicable Diseases</i>
NS	Proteína não Estrutural do Vírus
NS1	Proteína não Estrutural 1
NS2A	Proteína não Estrutural 2A
NS2B	Proteína não Estrutural 2B
NS3	Proteína não Estrutural 3
NS4A	Proteína não Estrutural 4A
NS4B	Proteína não Estrutural 4B
NS5	Proteína não Estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacção em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PrM	Proteína da Pré-membrana
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucleíco
RT-PCR	Reacção em Cadeia da Polimerase em tempo real
SCD	Síndrome do Choque por Dengue
TNF α	Factor de Necrose Tumoral α
TOT	Transmissão Transovariana

WHO

World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

A dengue é uma arbovirose de etiologia viral, prevalente globalmente e de grande importância para a saúde pública. Causada pelo vírus dengue (DENV), a doença existe há mais de 200 anos (Guirakhoo *et al.*, 2004; Gubler, 2011).

É uma doença febril aguda e geralmente de evolução benígna podendo evoluir para forma grave na presença de distúrbios hemodinâmicos, caracterizados por manifestações hemorrágicas graves, derrames cavitários, choque devido ao aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento do plasma (Wills *et al.*, 2002).

Mosquitos do gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia* (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) são os potenciais vectores de transmissão do vírus. Em 1906, Bancroft comprovou a hipótese sugerida por Graham em 1903 ao demonstrar que o *Aedes aegypti* era o potencial vector do vírus uma vez que transmitia o mesmo para humanos voluntários após alimentar-se do sangue de um indivíduo com a febre da dengue (Rosen *et al.*, 1954).

O DENV possui 4 sorotipos geneticamente similares e antigenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) cujo genoma é constituído por uma única molécula de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11kb (Sabin, 1952; Westaway *et al.*, 1985; Gubler, 1998). Com base em análises de sequenciamento do genoma viral, foi possível identificar uma diferença nucleotídica em torno de 6% entre os DENV. Esta diferença permitiu classificação dos DENV em diferentes genótipos (Rico-Hesse, 1990; Lewis *et al.*, 1993).

A rápida expansão mundial dos DENV nos últimos 50 anos resultou na dispersão dos genótipos associados a uma maior gravidade. Hoje, o vírus é encontrado em todos os continentes, até mesmo na Europa, que não havia registos da circulação do vírus até 2008 (Kyle & Harris, 2008; Liu-Helmersson *et al.*, 2016). Apesar de ser uma doença viral tropical transmitida por mosquito (Kyle & Harris, 2008), foi registado em 2012 um surto de dengue na Ilha da Madeira em Portugal, o primeiro na Europa desde a década de 1920. Este surto enfatiza o potencial do ressurgimento da

circulação do DENV na Europa, dada a mudança climática (Liu-Helmersson *et al.*, 2016).

1.2. Histórico

Incertas e controversas são as especulações sobre a origem geográfica da doença e do seu nome actual (dengue). Rigau-Perez (1998) e Gubler (1998) apontam para Espanha como o país pioneiro para o uso deste nome, através de registos de cartas do palácio Real da Espanha datados de 12 de Junho de 1801 em que Maria Luísa (rainha da Espanha) referiu-se a doença do seguinte modo: “eu estava doente com uma doença chamada dengue e desde ontem tenho sangramento”. Embora Gubler e colaboradores (2014) consideraram a origem “swahili” citado por Christie (1872) como a origem mais aceite.

Epidemias similares a dengue registadas entre 1823 e 1870 em Zanzibar e Costa Leste Africana foram designadas “ki-dinga pepo” doença caracterizada por “caimbra súbita” causada por espíritos do mal. Posteriormente surgiram os nomes dinga ou denga, palavras usadas para descrever as epidemias. Christie (1872) citado por Rigau-Pérez (1998) e Gubler *et al.*, (2014) especulou que epidemia similar a dengue em St. Thomas registada em 1827 foi denominada febre dandy ou o/a dandy. Finalmente, a epidemia registada em 1828 em Cuba foi designada dunga e mais tarde dengue (nome actual). O uso do nome dengue tornou-se oficial há aproximadamente 32 anos, pois segundo *Council for International Organizations of Medical Sciences-CIOMS* (1983) sua empregação em documentos oficiais de nomenclatura médica tornou-se efectiva em 1983 (Gubler, 1998)

De acordo com Gubler (1998), o primeiro relato de epidemia sugestiva de dengue ocorreu entre os anos 1779 e 1780 no continente Africano, Asiático e Norte da América. Registos prévios de epidemias similares a dengue (febre das articulações) datam de 1770 em Botávia (Jakarta), Indonésia, Cairo e Egipto e 1780 na Filadélfia, Zanzibar (1823 e 1870), Calcutá (1824, 1853, 1871 e 1905), Índias Ocidentais (1827) e Hong Kong (1901). Contudo, acredita-se que registos de doenças com sintomatologia similar a dengue sejam ainda mais antigos, pois a enciclopédia chinesa de doença e

remédios constitui o registo mais antigo da dengue e foi pela primeira vez publicado durante a Dinastia Chin (265-420 A.D) editado durante a Dinastia Tang (610 A.D) e posteriormente durante a Dinastia Norte Sung (992 A.D). Considerada "veneno da água" a doença foi relacionada à insectos voadores associados à água (Gubler, 1997; 1998). Em 1635 e 1699 epidemias similares a dengue foram registadas em regiões ocidentais francesas e Panamá (Gubler, 1997; 1998).

A dengue tornou-se endêmica em muitos centros urbanos tropicais durante o século XX. A disrupção ecológica no Sudeste Asiático e pacífico durante e após a II Guerra Mundial proporcionou o aumento de doenças transmitidas por mosquitos. Neste período houve também um aumento na hiperendemicidade e emergência da dengue com sinais de gravidade. O registo da febre hemorrágica da dengue (FHD) nas Filipinas entre 1953-1954 foi considerado o primeiro relato e após 20 anos tornou-se na maior causa de morbidade infantil (Gubler, 1998). Entre 1980-1990 houve um incremento na distribuição da dengue e do respectivo vector em outras regiões do mundo como Índia, Paquistão, Leste da China e regiões do pacífico (Henchal e Putnak, 1990). Henchal e Putnak (1990) sugerem que as complicações da doença tenham sido anteriormente descritas em 1897 em *Queensland*, 1922 no Norte dos Estados Unidos, 1927 na África do Sul-Durban, 1928 na Grécia e 1931 em Taiwan.

O DENV foi um dos primeiros microorganismos a ser denominado vírus entre 1902 e 1907 e seu isolamento aconteceu na década 40 (1943 e 1944) durante a Segunda Guerra Mundial por Kimura e Hotta aquando da inoculação de soro de pacientes doentes em camundongos lactantes (Gubler, 1997; Teixeira *et al.*, 1999; Konishi e Kuno, 2013). No verão de 1943, Dr. Hotta (pesquisador japonês) isolou o serotipo DENV-1 a partir da amostra de sangue de um paciente chamado Mochizuki (nome atribuído a estirpe isolada) em Nagasaki, Japão. Contudo, devido às dificuldades para conservação das estirpes isoladas tais como: falta de gelo seco e constantes falhas no fornecimento de corrente elétrica para o funcionamento de congeladores, Dr. Hotta conservou as estirpes do DENV-1 através da passagem em camundongos (Konishi e Kuno, 2013).

Com a crise económica originada pela Segunda Guerra Mundial no país e consequente fraco fornecimento de camundongos, Dr. Hotta inoculou a estirpe Mochizuki em sua mãe para manutenção da mesma (Konishi e Kuno, 2013).

Em 1944, Sabin e colaboradores isolaram o vírus de soldados dos Estados Unidos na Índia, Nova Guiné e Havai. A existência de diferentes serotipos do mesmo vírus foi descoberta em 1945 por Sabin, que identificou cepas com características antigénicas diferentes, serotipos 1 e 2. Os serotipos 3 e 4 foram isolados em 1956 quando ocorreu uma epidemia de dengue hemorrágico no Sudeste Asiático (Teixeira *et al.*, 1999).

1.3. Ciclo de transmissão do vírus

O ciclo de transmissão dos DENV envolve hospedeiros vertebrados (o homem e primatas não humanos) e vectores (mosquitos do género *Aedes*) de comportamento alimentar hematofágico. O homem é o único hospedeiro que desenvolve e manifesta as formas clínicas da infecção (Gubler, 1998; 2002).

São considerados importantes vectores do DENV, o *Aedes aegypti* (principal vector e de origem africana), *Aedes albopictus*, *Aedes polynesienses* e *Aedes africanus* (vectores secundários). As fêmeas deste grupo de vectores tem hábitos alimentares hematofágicos e tornam-se infectadas pelo DENV ao se alimentarem de sangue de um hospedeiro vertebrado infectado. O vírus infecta deste modo as células epiteliais do intestino médio, e a incubação do vírus no vector ocorre durante 8-12 dias (incubação extrínseca) e passa posteriormente para a circulação hemolinfática, favorecendo-se, assim a passagem do vírus para as glândulas salivares dos mosquitos. Durante o processo de alimentação em outro hospedeiro susceptível o vírus é depositado no mesmo (Ponte e Ruffino-Neto, 1994).

Os ciclos de transmissão silvestre e urbano favorecem a manutenção dos DENV na natureza (Gubler, 2002; Vasilakis e Weaver, 2008; Chen e Vasilakis, 2011). O ciclo de transmissão silvestre é mediado por mosquitos *Aedes* do subgénero *Stegomyia*, *Deceromyia* e *Finlaya*, e primatas não humanos em ambientes florestais do Sudeste

Asiático e África Ocidental (Gubler, 1998; Wang *et al.*, 2000; Vasilakis e Weaver, 2008; Chen e Vasilakis, 2011).

Baseados em evidências do comportamento alimentar oportunista (com sangue humano) dos mosquitos arbóreos, Chen e Vasilakis (2011) sugerem a transferência dos DENV das florestas para ambientes peridomiciliares, assim como consideram como zonas de emergência, as savanas que circundam florestas Africanas e Asiáticas (Figura 1).

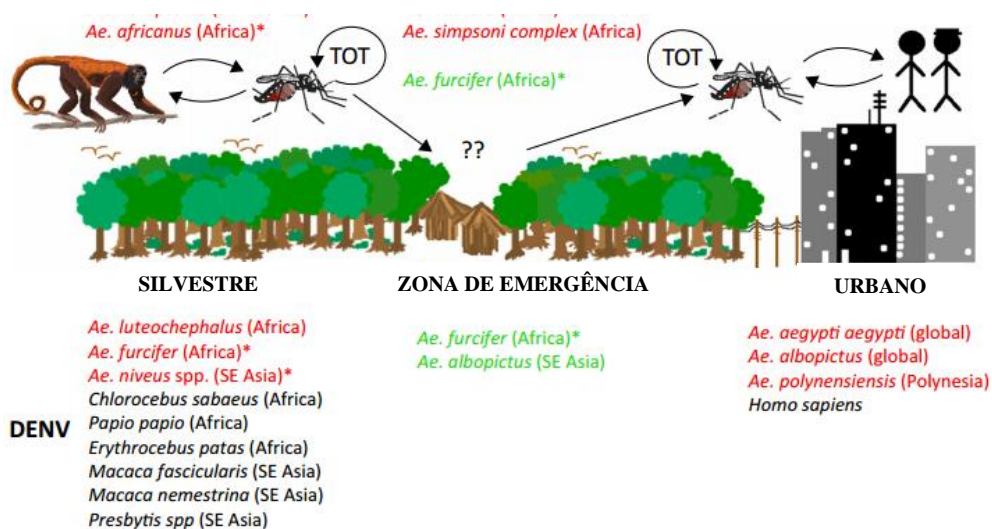


Figura 1: Esquema representativo dos ciclos de transmissão silvestre e urbano dos vírus da Dengue (adaptado de Vasilakis e Weaver 2017)

Os homens e os mosquitos de comportamento antropofílicos e hábitos alimentares hematofágicos por sangue humano constituem o ciclo de transmissão urbano (Vasilakis e Weaver, 2008; Chen e Vasilakis, 2011). O período médio de incubação do vírus no hospedeiro vertebrado, após transmissão pelo mosquito é de 4-7 dias (incubação intrínseca). Logo após este período é desencadeado um período de febre aguda acompanhada por sinais e sintomas inespecíficos por cerca de 2-10 dias. Neste período, de febre aguda o vírus circula a nível dos vasos periféricos (viremia), constituindo-se, assim o melhor período para infecção do mosquito durante a sua alimentação com o sangue de um indivíduo infectado (Gubler, 1998).

A transmissão vertical ou transovariana e a transmissão sem envolvimento do vector são também importantes (Chen e Wilson, 2005; WHO, 2009; Chen e Vasilakis, 2011). Na transmissão vertical a fêmea do mosquito transmite o vírus para a sua prole e este modelo é importante para a manutenção do vírus em períodos de seca prolongada ou períodos interepidêmicos (Chen e Vasilakis, 2011). A transmissão sem envolvimento do vector ocorre por material perfurocortante contaminado por sangue de pacientes infectados, por transplante de medula óssea e sugere-se também a transmissão do vírus por transfusão sanguínea (Chen e Wilson, 2005).

1.4. Morfologia e estrutura do vírus

Em relação às características físico-químicas, os flavivírus apresentam um coeficiente de sedimentação de 170-210S e uma densidade de flutuação de 1,19-1,23 g/cm³. São sensíveis a raios ultravioleta, detergentes iônicos e não iônicos, e sua infectividade reduz 50% a cada 10 min quando submetidos a 50°C. Condições de pH entre 7 a 9, temperaturas -70°C ou liofilização e conservação a 4°C não afectam a infectividade dos DENV (Brinton, 1986; Lindenbach *et al.*, 2007).

Morfologicamente, os DENV são esféricos e envelopados com cerca de 40-50 nanômetros de diâmetro (Gubler, 1998). O RNA e o capsídeo formam um nucleocapsídeo icosaédrico constituído pela proteína C. Na parte externa, o vírus é circundado por uma bicamada lipídica associada às proteínas da membrana (prM/M) e pela proteína E do envelope que forma projecções de 5-10nm de comprimento e terminações arredondadas de 2nm de diâmetro (Brinton, 1986; Rice *et al.*, 1985). A proteína precursora da membrana (prM) constitui partículas virais imaturas e não infecciosas (Figura 2-A e B). A proteína da membrana (M) é produzida na via de secreção durante a maturação da partícula viral (Figura 2-C e D) através da clivagem da prM pela protease celular (Lindenbach *et al.*, 2007).

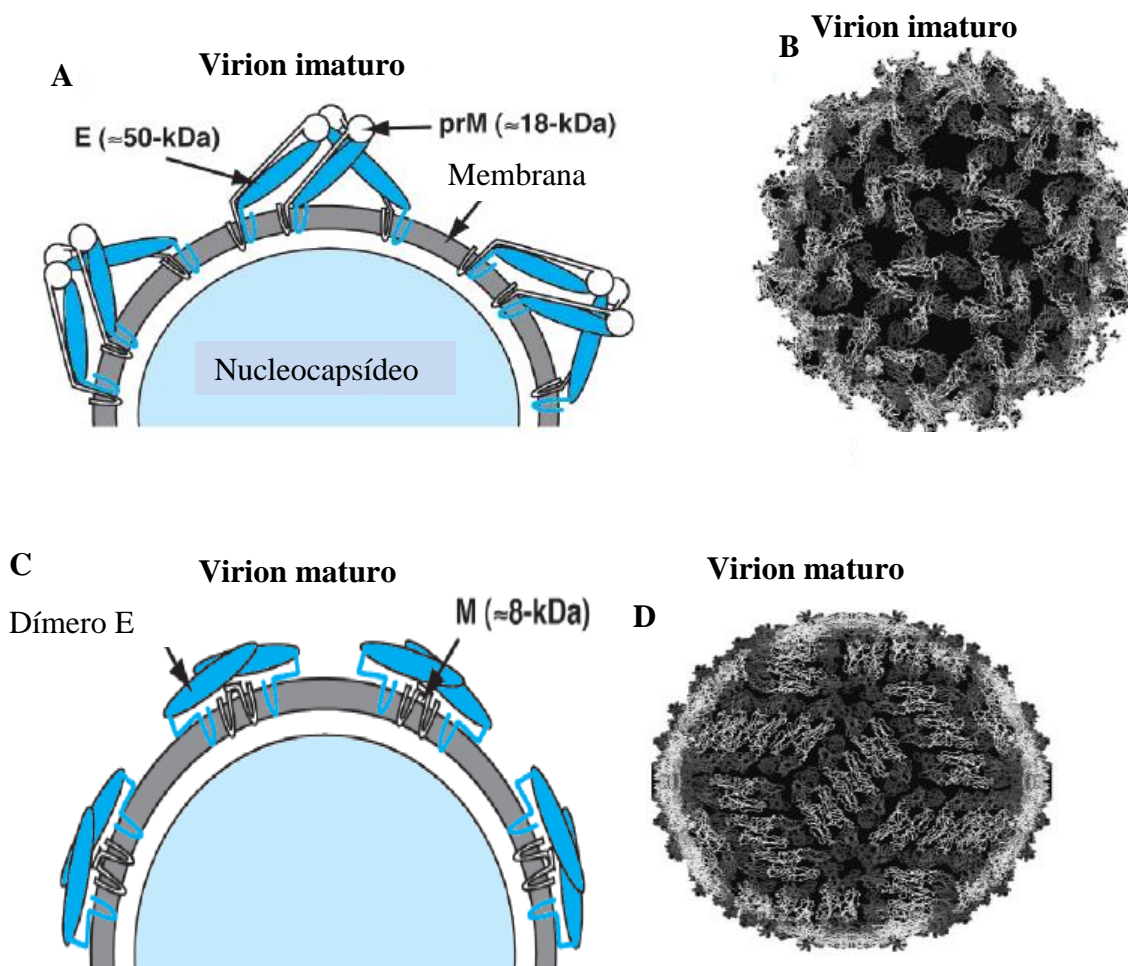


Figura 2: Representação da estrutura dos flavivírus. **A:** Proteína do envelope de uma partícula viral imatura. **B:** Reconstrução de uma partícula imatura do DENV. **C:** Proteína do envelope de uma partícula viral madura. **D:** Reconstrução de uma partícula madura do DENV (adaptado de Lindenbach *et al.*, 2007).

O genoma dos Flavivírus replica-se no citoplasma da célula hospedeira (Lindenbach *et al.*, 2003), comportando-se como um RNA mensageiro e possui uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) de aproximadamente 10 mil bases nucleotídicas (Chambers *et al.*, 1990). A ORF codifica uma única poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos que é posteriormente

clivada co e pos-traducionalmente, pelas proteases virais e da célula hospedeira, em 3 proteínas estruturais (capsídeo, membrana e envelope) na região N-terminal e 7 não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Chambers *et al.*, 1990; Twiddy *et al.*, 2002; Lindenbach *et al.*, 2003). As proteínas não estruturais são expressas quando os vírus infectam as células hospedeiras e somente partículas virais maduras possuem as proteínas estruturais (Henckal e Putnak, 1990; Miller *et al.*, 2010). O genoma viral possui, ainda, duas regiões não traduzidas (UTR/NTR) de ~100 e 450 pares de bases entre as regiões 5' e 3' (Twiddy *et al.*, 2002), Figura 3.

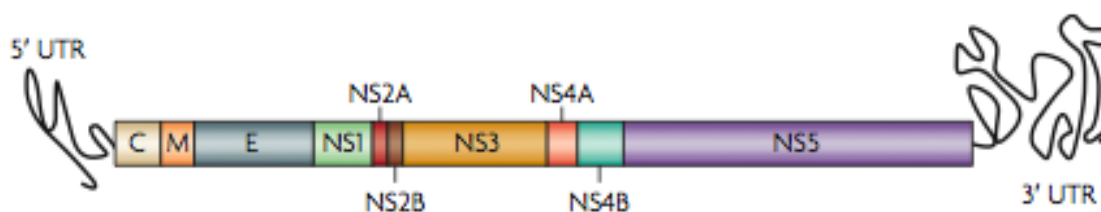


Figura 3: Esquema organizacional do genoma viral do DENV. Regiões 5' e 3' não codificantes (NC). A ORF codifica três proteínas estruturais (as glicoproteínas do capsídeo (C), da membrana (M) e do envelope (E) e, sete glicoproteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

Fonte: Guzmán *et al.*, 2010

1.4.1. Proteínas estruturais e não estruturais

O capsídeo é constituído pela proteína C, a primeira a ser sintetizada durante o processo de tradução. Possui massa molecular de aproximadamente 11kDa e possui cerca de 25% de resíduos de lisina e arginina (Henckal e Putnak, 1990; Lindenbach *et al.*, 2003). De carácter hidrofóbico, é responsável por conferir a forma esférica ao vírus (Henckal e Putnak, 1990).

Partículas virais imaturas tem a superfície composta pelo heterodímero E-prM. A proteína prM é glicosilada e tem 22kDa de peso molecular. Durante a maturação viral, que ocorre em vesículas de carácter ácido, sobrevem a clivagem proteolítica da prM por uma protease da célula hospedeira do tipo furina que antecede como última etapa antes da libertação da partícula infecciosa pela via exocítica do apparatus de golgi, para

a produção da proteína M de (8kDa). Este processo é crucial para a morfogênese do vírus e induz a intensificação da infectividade do vírus e está envolvida na reorganização da estrutura viral (Henckal e Putnak, 1990; Weaver e Vasilakis, 2009).

Partículas virais maduras possuem um envelope que é constituído pela glicoproteína E (homodímero) de 53kDa. Em partículas virais imaturas esta se apresenta como heterodímero (E-prM). A proteína possui resíduos conservados de cisteínas ligados por pontes dissulfídicas que são responsáveis pela sua estrutura. A função protetora do genoma do vírus é atribuída a lípidos presentes no envelope (Chambers *et al.*, 1990; Henckal e Putnak, 1990; Weaver e Vasilakis, 2009). É a maior proteína estrutural do virion, sendo responsável pelas principais propriedades biológicas do vírus (Modis *et al.*, 2004)

A proteína E possui 3 domínios (I, II e III) que lhe conferem a capacidade de mediar a ligação e fusão do envelope a receptores de membrana da célula hospedeira durante a penetração, responsáveis também pela resposta imune por anticorpos de neutralização, hemaglutinação, e confere o alto poder antigénico ao envelope (Henckal e Putnak, 1990; Figueiredo, 1999; Weaver e Vasilakis, 2009). O domínio I é orientado paralelamente a membrana do vírus e contém radical amino terminal; o domínio II é estabilizado por 3 pontes dissulfídicas e possui um par de alças descontínuas sendo uma altamente conservada entre os flavivírus e é importante peptídeo de fusão (Weaver e Vasilakis, 2009); o domínio III, que inclui o C-terminal, localiza-se na superfície lateral externa do dímero e está associado a virulência por possuir resíduos que também auxiliam a determinação de hospedeiros e tropismo. Já foi referido seu papel na virulência, do genótipo americano do DENV-2 (Figueiredo, 1999; Weaver e Vasilakis, 2009).

As proteínas não estruturais estão envolvidas na modulação da resposta do hospedeiro e na replicação do RNA viral (Khromykh e Westaway, 1997) e podem desempenhar funções na montagem, organização e liberação do vírus (Lindebach *et al.*, 2007).

A glicoproteína NS1 de 48kDa é hidrofílica, possui um elevado grau de homologia entre todos os flavivírus. Dentre os serotipos do DENV sua similaridade é superior a 70%. É sintetizada no retículo endoplasmático e posteriormente transportada

para o apparatus de golgi. Pode também ser transportada para a membrana plasmática ou ser secretada pela célula hospedeira que ao expressar a NS1 na sua superfície torna-se alvo da citólise imunológica. Para além da importância imunológica a NS1 é importante para a morfogênese do vírus (Henckal e Putnak, 1990; Weaver e Vasilakis, 2009).

A proteína NS2A de 20-22kDa tem vários domínios transmembranares, é importante para processos como proteólise da terminação C do NS1 e coordenação do processo entre replicação e empacotamento do RNA. Estudos demonstraram que mutações nesta proteína interferem na montagem e secreção da partícula viral pela célula hospedeira (Kummerer e Rice, 2002). Pouco se sabe sobre o papel da NS2B (14-145kDa) na replicação viral, mas especula-se sua associação com a proteína NS3 de 70kDa para formar o complexo de proteases virais e serve como co-factor para activação da protease serina. Sua sequência apresenta sete domínios hidrofóbicos que estão relacionados à interacção com membranas, como também, ao correcto direccionamento do core hidrofílico central (Brinkworth *et al.*, 1999).

A proteína NS3 (68kDa) é uma proteína multifuncional, altamente conservada entre os flavivírus. Possui no mínimo três actividades bioquímicas distintas que por sua vez comporta-se como uma RNA protease do tipo tripsina, helicase e trifosfatase, envolvida no processamento pos-traducional da poliproteína e replicação viral (Lindenbach e Rice, 2003).

Não existem evidências directas sobre a função das proteínas NS4a e NS4b. No entanto, estudos sugerem que a proteína NS4a está ancorada à membrana do retículo e interage com as proteínas NS1, NS3 e NS5 (Westaway *et al.*, 2003). Também, acredita-se que as proteínas NS4a e NS4b (16kDa e 27kDa, respectivamente) funcionem como co-factores no complexo de replicação e também como inibidores do interferon e indutores de célula T (Henckal e Putnak, 1990; Weaver e Vasilakis, 2009).

A NS5 é uma proteína também multifuncional de 103-105kDa também altamente conservada entre todos os flavivírus. A análise dessas sequências possibilitaram a determinação de dois sítios. O primeiro encontrado na região C-terminal do gene, que possui uma sequência de nucleótidos similar a RNA polimerase, o que lhe permite funcionar como uma RNA polimerase RNA dependente (RdRp) e serve para indução

da interleucina 8 e, o segundo encontrado na região N-terminal, responsável pela actividade metiltransferase (Henckal e Putnak, 1990; Weaver e Vasilakis, 2009; Herrero *et al.*,2013).

1.5. Classificação e diversidade genética dos DENV

O DENV pertence à família *Flaviviridae* composta por 4 gêneros: *Hepacivirus*, *Pestivirus*, *Flavivirus*, e *Pegivirus* (Pierson e Diamond, 2013; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>, 2016).

O gênero *Flavivirus* ao qual pertence o DENV possui 73 vírus classificados em 53 espécies. Os sorotipos do DENV foram identificados com base em testes serológicos e estes por sua vez dividem-se em diferentes grupos genotípicos (Tabela 1) identificados inicialmente pela técnica de *fingerprinting* (Trent *et al.*,1983) e posteriormente pela técnica de sequenciamento do genoma viral (Rico-Hesse, 1990; Weaver e Vasilakis, 2009).

Segundo Rico-Hesse (1990) e Chen e Vasilakis (2011), os grupos genotípicos são formados por cepas com diferença nucleotídica $\geq 6\%$ em uma determinada região do genoma. Assim, para o serotipo DENV-1 são descritos 5 genótipos: Genótipo I referente a estirpes do Sudeste Asiático, China e Leste Africano; Genótipo II referente a estirpes de 1950 e 1960 da Tailândia; Genótipo III referente a estirpes selvagens da Malásia; Genótipo IV referente a estirpes da Austrália e Ilhas do Oeste do Pacífico; Genótipo V referente a estirpes do Oeste Africano, Ásia e América (Gonçalves *et al.*, 2002; Weaver e Vasilakis, 2009; Chen e Vasilakis, 2011).

Constituem o serotipo DENV-2 os seguintes genótipos: Genótipo Asiático I referente a estirpes da Malásia, Tailândia, Combodia, Myanmar, Vietname e Austrália; Genótipo Asiático II referente a estirpes da china, Sri Lanka, Taiwan, Filipinas, Índia, Honduras, Indonésia e México; Genótipo Cosmopolita (com vasta distribuição geográfica) referente a estirpes do Leste e Oeste Africano, Austrália, Ilhas dos Oceanos Índico e Pacífico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio; Genótipo Americano referente a estirpes de 1950 e 1960 das Ilhas do Pacífico, Subcontinente Indiano, Caribe e América do Sul e Central; Genótipo do Sudeste Asiático/Americano

referente a estirpes do Sudeste Asiático e estirpes Americanas identificadas entre 1981-2011; Genótipo Selvagem que reúne estirpes selvagens identificadas em humanos, primatas não humanos e mosquitos das florestas do Sudeste Asiático e Oeste Africano (Weaver e Vasilakis, 2009; Chen e Vasilakis, 2011).

O serotipo DENV-3 distingue-se em 5 genótipos a citar: Genótipo I que reúne estirpes da Indonésia, Malásia, Filipinas, Taiwan, Singapura e Ilhas do Sul do Pacífico como Fiji e Tahiti; Genótipo II que reúne estirpes do Bangladesh, Tailândia, Singapura, Indonésia, Taiwan, Combodia, China, Japão e Myanmar; Genótipo III, geograficamente mais disperso dentre os genótipos do DENV-3, reúne estirpes da Índia, Sri Lanka, Leste da África, Samoa, Taiwan, América Central e do Sul, Singapura, Caribe, Japão e estirpes importadas para Europa; Genótipo IV, geneticamente mais diferente dos outros genótipos do DENV-3, reúne estirpes do Porto Rico, América Central e América Latina; Genótipo V, inclui o protótipo do DENV-3 (H87-1956) das Filipinas, estirpes do Japão, do Brasil e da China (Weaver e Vasilakis, 2009; Chen e Vasilakis, 2011);

Quatro (4) genótipos pertencem ao serotipo DENV-4 a citar: Genótipo I, que reúne estirpes do Japão, Tailândia, Sri Lanka, Filipinas, Vietnam, Myanmar, Malásia, Índia, China e Brasil. Este Genótipo inclui, também o protótipo de DENV- 4 (H241) isolado nas Filipinas em 1956 ; Genótipo II, reúne estirpes da Indonésia, Malásia, Tahiti, Singapura, Caribe, América , China, Austrália e Ilhas do Pacífico Ocidental ; Genótipo III, reúne 5 estirpes da Tailândia isoladas entre 1997-2001 e são diferentes de todas outras estirpes isoladas na Tailândia; Genótipo IV, reúne 3 estirpes selvagens da Malásia (Weaver e Vasilakis, 2009; Chen e Vasilakis, 2011).

Tabela 1: Classificação dos genótipos dos DENV baseada na análise filogenética das sequências do gene do envelope (Weaver e Vasilakis, 2009; Chen e Vasilakis, 2011)

Serotipo	Genótipo	Distribuição geográfica
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Leste Africano
	II	Tailândia (1950-1960)
	III	Malásia (estirpes selvagens)
	IV	Austrália e Ilhas do Oeste do Pacífico
	V	Oeste Africano, Ásia e América
DENV-2	Asiático I	Malásia, Tailândia, Comodora, Myanmar, Vietname e Austrália
	Asiático II	China, Sri Lanka, Taiwan, Filipinas, Índia, Honduras, Indonésia e México
	Cosmopolita	Leste e Oeste Africano, Austrália, Ilhas dos Oceanos Índico e Pacífico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	Americano	Ilhas do Pacífico (1950-1960), Subcontinente Indiano, Caribe e América do Sul e Central
	Sudeste Asiático/Americano	Sudeste Asiático e estirpes Americanas (1981-2011)
	Selvagem	Sudeste Asiático e Oeste Africano
DENV-3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas, Taiwan, Singapura e Ilhas do Sul do Pacífico (Fiji e Tahiti)
	II	Bangladesh, Tailândia, Singapura, Indonésia, Taiwan, Comodora, China, Japão e Myanmar
	III	Índia, Sri Lanka, Leste da África, Samoa, Taiwan, América Central e do Sul, Singapura, Caribe, Japão e Europa (estirpes importadas)
	IV	Porto Rico, América Central e América Latina
	V	Filipinas (H87-1956), Japão, Brasil e China
DENV-4	I	Japão, Tailândia, Sri Lanka, Filipinas (H241-1956), Vietnam, Myanmar, Malásia, Índia, China e Brasil
	II	Indonésia, Malásia, Tahiti, Singapura, Caribe, América, China, Austrália e Ilhas do Pacífico Ocidental
	III	Tailândia (1997-2001)
	IV	Malásia (estirpes selvagens)

1.6. Replicação viral

As células dendríticas, monócitos, macrófagos, células linfóides e hepatócitos são as principais células alvo para infecção pelos DENV (Jessie *et al.*, 2004; Mukhopadhyay, 2005; Ross, 2010; Chawla *et al.*, 2013). A entrada do vírus na célula ocorre por endocitose que é seguida pela entrada do nucleocapsídeo na citoplasma e posterior libertação do genoma viral e sua replicação (Mukhopadhyay, 2005; Lindenbach *et al.*, 2007; Ross, 2010). O pH ácido do endossomo que induz a mudança conformacional do envelope e os receptores celulares de superfície específicos para a proteína do envelope (exemplo: DC-SIGN das células dendríticas) e favorecem a ligação e fusão do envelope viral à membrana da célula alvo (Lindenbach *et al.*, 2007; Ross, 2010).

A replicação viral ocorre nas vasículas membranosas, que correspondem a invaginações induzidas pelas proteínas NS3 e NS4a no retículo endoplasmático.

No processo de replicação, ocorre inicialmente a síntese do RNA de polaridade negativa e posterior síntese de moléculas de RNA progênie. As fitas de RNA progênie (+) servem de molde para geração de outras fitas complementares de polaridade negativa assim como para montagem das novas partículas virais (Lindenbach *et al.*, 2003). A montagem das partículas virais consiste no empacotamento do genoma viral pelo capsídeo (formação do nucleocapsídeo) e posterior cobertura pelo envelope no lúmen do retículo endoplasmático. Os virions imaturos migram pelo complexo de golgi, são clivados por proteases celulares gerando partículas virais maduras que são posteriormente libertados da célula hospedeira por exocitose (Mukhopadhyay, 2005; Lindenbach *et al.*, 2007) (Figura 4).

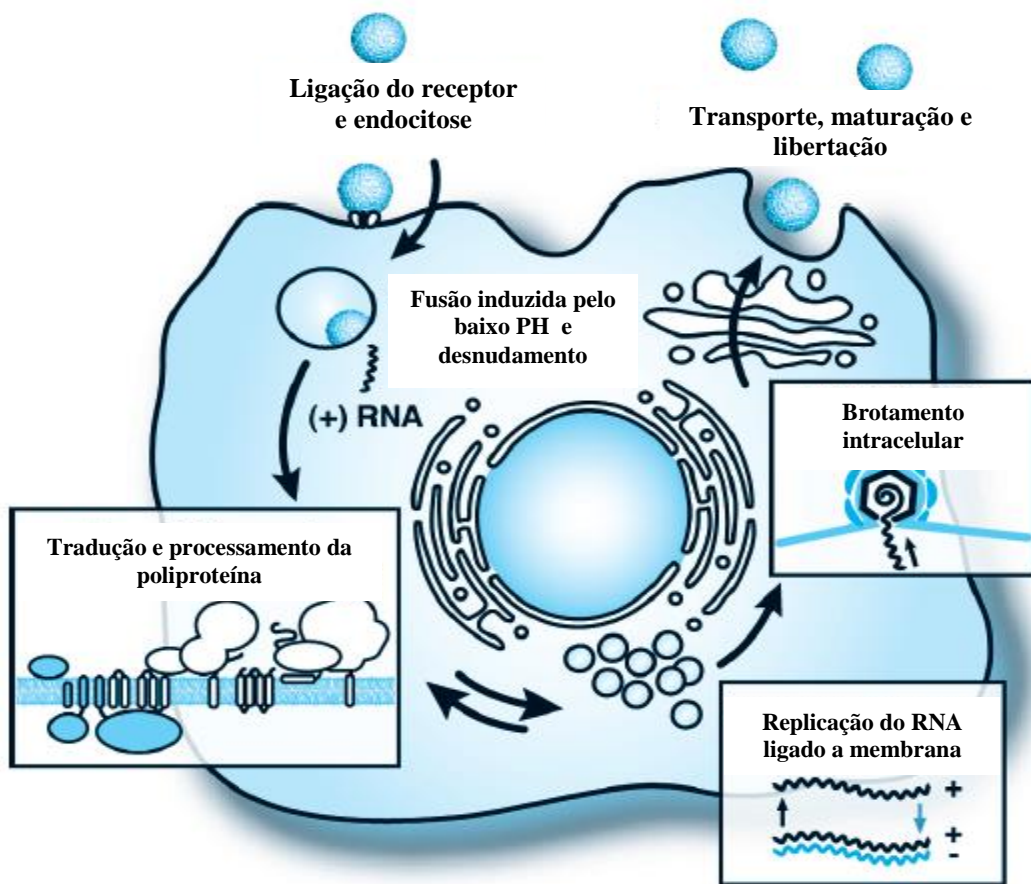


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de replicação dos DENV (adaptado de Lindenbach *et al.*, 2007).

1.7. Manifestações clínicas e classificação da dengue

A dengue pode muitas vezes ser confundida com viroses exantemáticas, gripe, sarampo, rubéola ou enterovirose devido aos seus sinais e sintomas de largo espectro (WHO, 2009). Todos os serotipos de DENV causam manifestações clínicas que variam desde formas assintomáticas similares a gripe à formas letais caracterizadas por extravasamento de plasma com ou sem hemorragia (WHO, 2009; Domingo *et al.*, 2011). O período de incubação intrínseca varia de 3 a 14 dias, mas é em média, de 4 a 7 dias. São descritos sinais como dor muscular, dor na coluna, nos olhos, nos membros, mal estar, rash, náuseas, vômitos, fadiga, anorexia, erupção, febre de 39.4 a 41.1°C e cefaléia. Outros sinais e sintomas incluem fotofobia, sudorese, tosse, disúria, alterações do paladar, letargia, linfadenopatia (George e Lum, 2014).

Ashburn e Craig, 1907; George e Lum, 2014 referiram a leucopenia com a redução de leucócitos polimorfonucleares e um aumento de pequenos linfócitos inespecíficos (linfocitose) como resultados de testagem laboratorial de amostras positivas para dengue (George e Lum, 2014).

A trombocitopenia é referida em casos de FHD/SCD. Também são referidos o aumento de megacariócitos, eosinófilos e granulócitos. Durante a infecção pelo DENV pode ocorrer um aumento da permeabilidade vascular com a consequente hipovolemia vascular e encefalopatia grave (George e Lum, 2014). Em casos febre hemorrágica pode-se verificar petéquias, sangramento gengival e gastrointestinal, menorragia e hematúria. Essa perda de sangue pode conduzir a um síndrome do choque e morte, quando grave.

A classificação da dengue é muito importante para o acompanhamento apropriado dos pacientes assim, a OMS sugeriu recentemente uma nova classificação como: Dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG) (Figura 5) (WHO, 2009a).

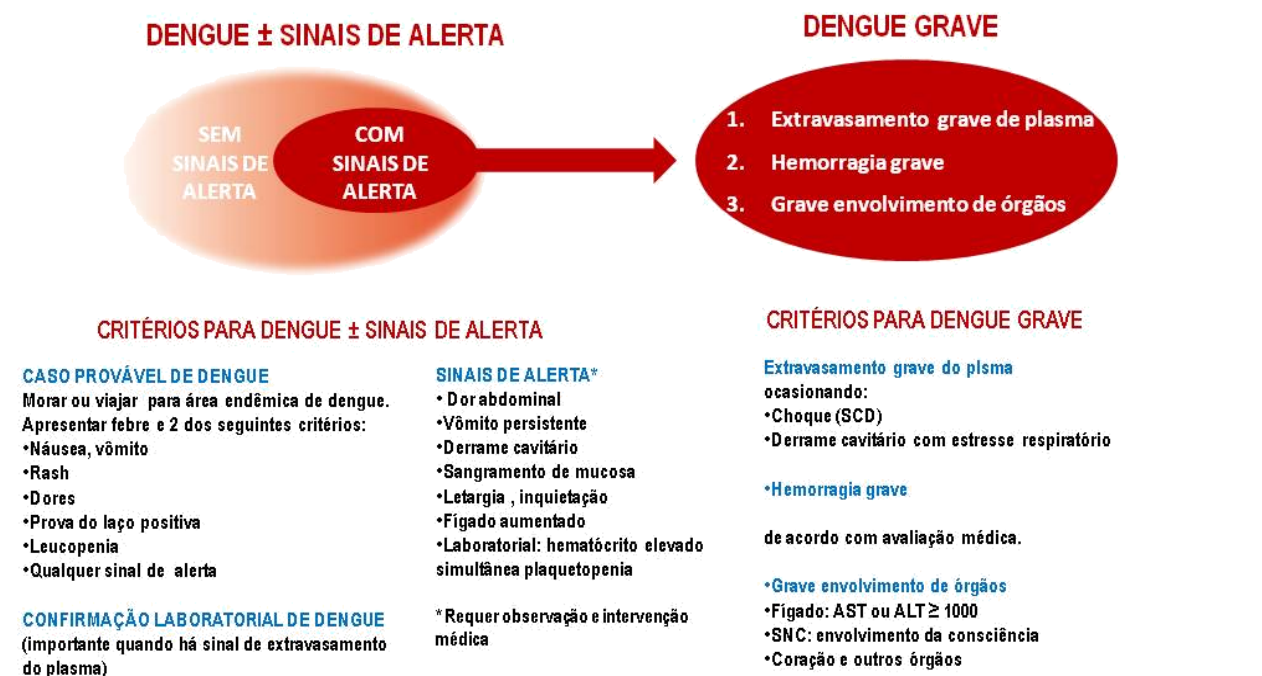


Figura 5: Classificação da dengue proposta pela OMS, 2009. (WHO, 2009a)

1.8. Diagnóstico laboratorial

A infecção pelo DENV produz uma série de sintomas inespecíficos que tornam difícil o diagnóstico clínico (WHO, 2009a; Ross, 2010). Assim, o diagnóstico laboratorial é de extrema importância para a confirmação dos casos em programas de vigilância epidemiológica, controlo de surtos, pesquisa, ensaios clínicos, desenvolvimento de vacinas, assim como para melhor conduta clínica dos mesmos (WHO, 2009a).

Os métodos de diagnóstico laboratorial da infecção por DENV incluem, a detecção do RNA viral em amostras de soro, plasma, células sanguíneas e em outros tecidos, os testes serológicos para detecção do antígeno NS1 e/ou anticorpos IgM e IgG anti-DENV e a combinação dos testes moleculares e serológicos (WHO, 2009a; Ross, 2010; CDC, 2016).

O resultado do diagnóstico é influenciado pelo estágio da infecção e intervalo de tempo entre início dos sintomas e a colheita de amostras. Na fase aguda da infecção (até 5 dias após o início dos sintomas), recomenda-se o diagnóstico directo por isolamento viral em cultura celular, detecção do RNA por transcrição reversa seguida pela reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR) e detecção dos antígenos virais por *Enzyme-linked Immunosorbent assay* (ELISA) (WHO, 2009a; Peeling *et al.*, 2010). A infecção aguda pode ainda ser confirmada pela detecção do RNA e antígenos virais NS1 em amostras de tecido colhidas por autópsia usando análises de imunofluorescência ou imunohistoquímica (CDC, 2016).

O diagnóstico indirecto por detecção dos anticorpos IgM (Imunoglobulina M) e IgG (Imunoglobulina G) é recomendado após a fase aguda (WHO, 2009a; Peeling *et al.*, 2010; CDC, 2016). O diagnóstico serológico para detecção dos anticorpos anti-DENV é ainda influenciado pela imunidade do hospedeiro (Figura 6). Em caso de indivíduos sem exposição prévia ao vírus por infecção anterior ou imunização (infecção primária) a IgM pode ser rapidamente detectado entre 5-10 dias de infecção. A IgM permanece na circulação por cerca de 2 semanas após o desaparecimento dos sintomas e atinge níveis indetectáveis 2-3 meses depois. A IgG pode ser detectada no final da primeira semana de doença porém em títulos baixos. Seu aumento na

circulação acontece de forma lenta permanendo detectável por vários meses (WHO, 2009a).

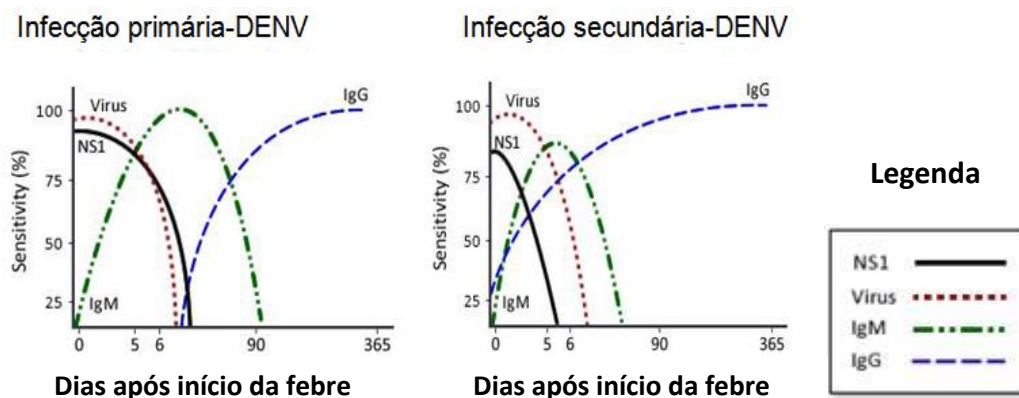


Figura 6: Período estimado da infecção pelo DENV em dias e os alvos dos métodos diagnósticos que podem ser usados para detectar a infecção (adaptado de CDC, 2016)

Em caso de infecção secundária os anticorpos IgG podem ser detectados em altos níveis ainda na fase aguda da infecção e os anticorpos IgM são detectados em títulos menores que os casos de infecção primária. O rácio dos anticorpos IgM/IgG são os mais usados para distinguir casos de infecção primária e secundária (WHO, 2009a).

1.9. Patogênese da infecção pelo DENV

A compreensão dos mecanismos da patogênese da infecção pelo DENV e a evolução para doença grave é prejudicada pela falta de um modelo animal que desenvolva a doença de forma similar ao hospedeiro humano (Rico-Hesse, 2009; Simmons *et al.*, 2012).

Dentre as teorias propostas para explicar o alto grau de variação das manifestações clínicas causadas pelos DENV, está a teoria relacionada à virulência da estirpe viral (Rosen, 1977; Rico-Hesse, 1990; Kumaria, 2010), das infecções sequenciais (Halstead, 1988; Gubler 1988; Simmons *et al.*, 2006) e da intensa ativação da célula T com o aumento exacerbado de citocinas como TNF- α , IFN-gama, IL-6, IL-2, IL10 (Azeredo *et al.*, 2001) que aumentam a permeabilidade vascular e resultam no

extravasamento de plasma, procedendo a hemoconcentração e por vezes o choque hipovolémico (Basu, 2008).

Na teoria da virulência da estirpe viral, Rosen, (1977) e Rico-Hesse, (1990) referem que as estirpes virais diferem na sua capacidade antigénica e que este factor estaria associado a dengue grave. Casos de dengue clássica registados nas florestas da África Ocidental (Robin *et al.*, 1980), Vietname (WHO, 1976) e Malásia (Rudnick, 1965) causados por estirpes do DENV-2 específico para primatas não humanos, e os casos de febre hemorrágica da dengue com 158 mortes registadas em Cuba em 1981, causados pelo DENV-2 (Kouri *et al.*, 1986), são exemplos que suportam a teoria da virulência viral.

Outras evidências são os casos de dengue registados na Venezuela em 1989 em que foram identificados os serótipos DENV-1, 2 e 4, onde os casos graves foram associados ao serotipo 2 (PAHO, 1990).

Rico-Hesse (1997) demonstrou a introdução do DENV-2, genótipo Sudeste/Asiático e conseqüente ocorrência da FHD na Venezuela, Brasil, Colômbia e México. Este cenário diferiu dos casos de febre da dengue causados pelo DENV-2 genótipo Americano nos mesmos países. Estas diferenças podem estar associadas a diferente capacidade viral de adaptação ao vector e a factores que favorecem a replicação no hospedeiro. Como por exemplo: o DENV-2 genótipo asiático replicar melhor em monócitos derivados de células dendríticas quando comparados ao genótipo americano do mesmo serótipo (Vasilakis *et al.*, 2007).

Factores virais como a diferença na estrutura do genótipo/serotipo também estão associados à patogênese da infecção pelo DENV. Análises do genoma completo sugerem diferenças nucleotídicas entre os genótipos asiático e americano no DENV-2, especificamente no aminoácido da posição 390 da proteína do envelope (principal determinante antigénico) (Vasilakis e Weaver, 2008). Este resíduo, associado com a ligação do vírus à célula hospedeira apresenta variações polimórficas que quando relacionadas a pressão selectiva afectam a virulência dos diferentes genótipos do DENV-2 (Twiddy, 2002; Vasilakis *et al.*, 2008).

A teoria da ocorrência de dengue grave mais aceite é a teoria da infecção sequencial por diferentes serótipos, também descrita como infecção secundária ou

antibody dependent enhancement (ADE) (Gubler, 1998). A infecção primária por um dos DENV induz a produção de uma imunidade homotípica de longa duração mediada por anticorpos neutralizantes contra a proteína E do vírus infectante (Gubler, 1988; Halstead, 1988) e estimula, também a produção de uma imunidade heterotípica de curta duração mediada por anticorpos sub-neutralizantes (Sabin, 1952). Esta imunidade heterotípica de curta duração é considerada factor de risco para ocorrência da gravidade da dengue em caso de infecção secundária por um serotipo heterólogo (Gubler, 1988; Halstead, 1988; Guzmán *et al.*, 2006; Domingo *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013), visto que, na infecção secundária por um serotipo diferente da infecção primária, ocorre a formação de imunocomplexos entre o vírus infectante e os anticorpos IgG subneutralizantes, que facilitam a infecção dos fagócitos mononucleares através do receptor Fc (fragmento cristalizável). Neste modelo há um aumento do número de células infectadas, com elevação da replicação viral (Gubler, 1988; Halstead, 1988; Rothman e Ennis, 1999).

A teoria da activação dos linfócito T de memória relacionadas a infecção primária deve também ser considerada, pois sua correlação com monócitos infectados pode resultar num aumento da permeabilidade vascular por diversos mecanismos como, por exemplo, a produção de citocinas pelos linfócitos TCD4+ e TCD8+ específicos. Os linfócitos TCD4+ e TCD8+ produzem IFN γ (Kurane *et al.*, 1989; Gagnon *et al.*, 1999). Os linfócitos TCD4+ produzem também moléculas de TNF α e β , IL-2, IL-6, IL-10 (Azeredo *et al.*, 2010), IL-8, IL-12 e MCP-1. Estas citocinas induzem o multifuncionamento das células do endotélio vascular e consequente extravasamento do plasma (Kurane, 2007).

Outro mecanismo da imunopatogênese viral relacionada aos linfócitos T é a lise de células alvo infectadas pelo mecanismo dependente de perforinas (Kurane, *et al.*, 1989; Rothman e Ennis, 1999).

A activação do sistema complemento (C3a e C5a) pelos imunocomplexos circulantes detectado em pacientes com FHD deve também contribuir para as diferentes manifestações clínicas da infecção pelo DENV e principalmente para o extravasamento do plasma (Kurane, 2007). A activação do complemento, associada à

trombocitopenia e coagulação disordenada aumentam a permeabilidade vascular e consequente risco para ocorrência de hemorragias (Whitehorn e Simmons, 2011).

Guzman e Kouri (2002) assumem a teoria da patogênese multifactorial (Figura 7) em que participam na patogênese os factores do hospedeiro, da sua imunologia, do vírus e factores epidemiológicos. Neste modelo, a alta densidade do vector, alta circulação do vírus e a susceptibilidade da população (população em risco para infecção secundária) são determinantes importantes para a ocorrência da dengue grave (Guzman e Kouri, 2002).

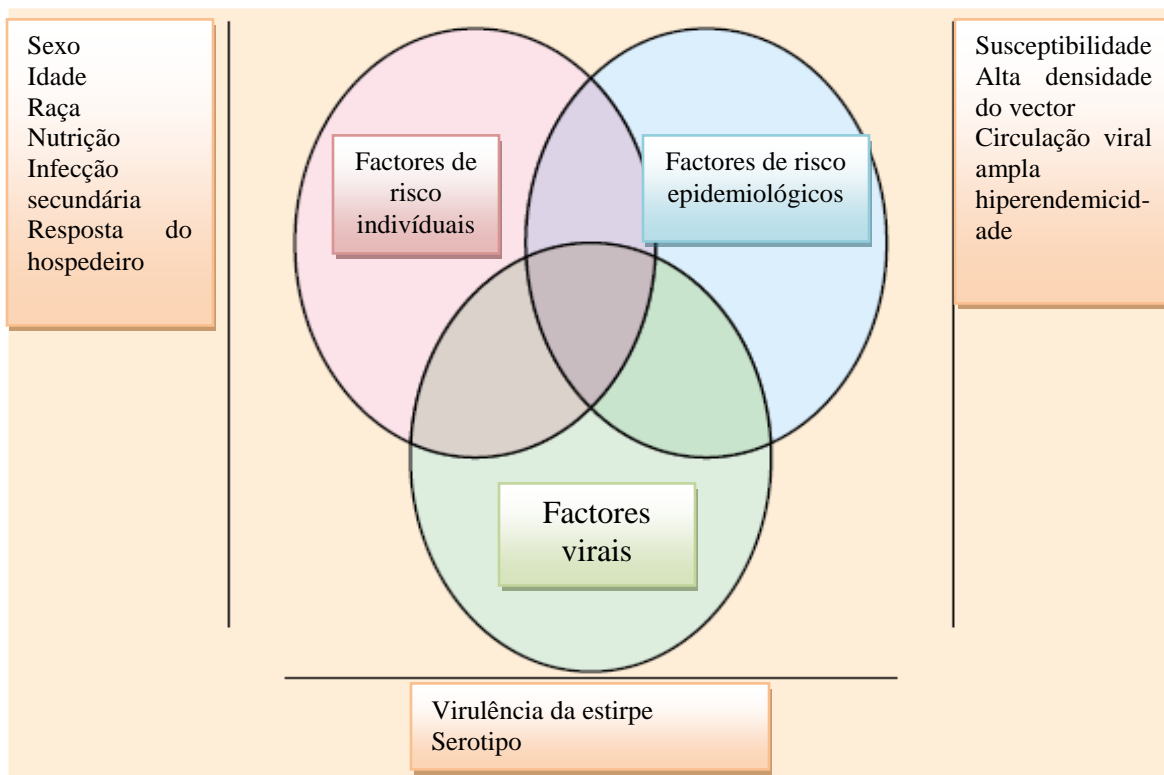


Figura 7: Factores de risco para ocorrência da dengue grave (adaptado de Guzman e Kourí, 2002)

1.10. Epidemiologia da dengue no mundo

O vírus e vector da dengue estão amplamente distribuídos pelo mundo há mais de 200 anos (Gubler e Clarck, 1995). Até 2015, estimava-se que de 70 a 500 milhões de infecções pelo DENV ocorriam anualmente em 124 países endêmicos e que aproximadamente 3,6 bilhões de pessoas encontravam-se em risco de contrair a

doença em países do Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental, Américas, África e Oriente Médio (Bhatt *et al.*, 2013; CDC, 2014; WHO, 2015a). Para além das áreas de risco referidas anteriormente, são também considerados endêmicos os países do Mediterrâneo Oriental. Estes, fazem parte dos mais de 100 países de clima tropical e subtropical (Figura 8) com risco de ocorrência da dengue (CDC, 2014; WHO, 2017).

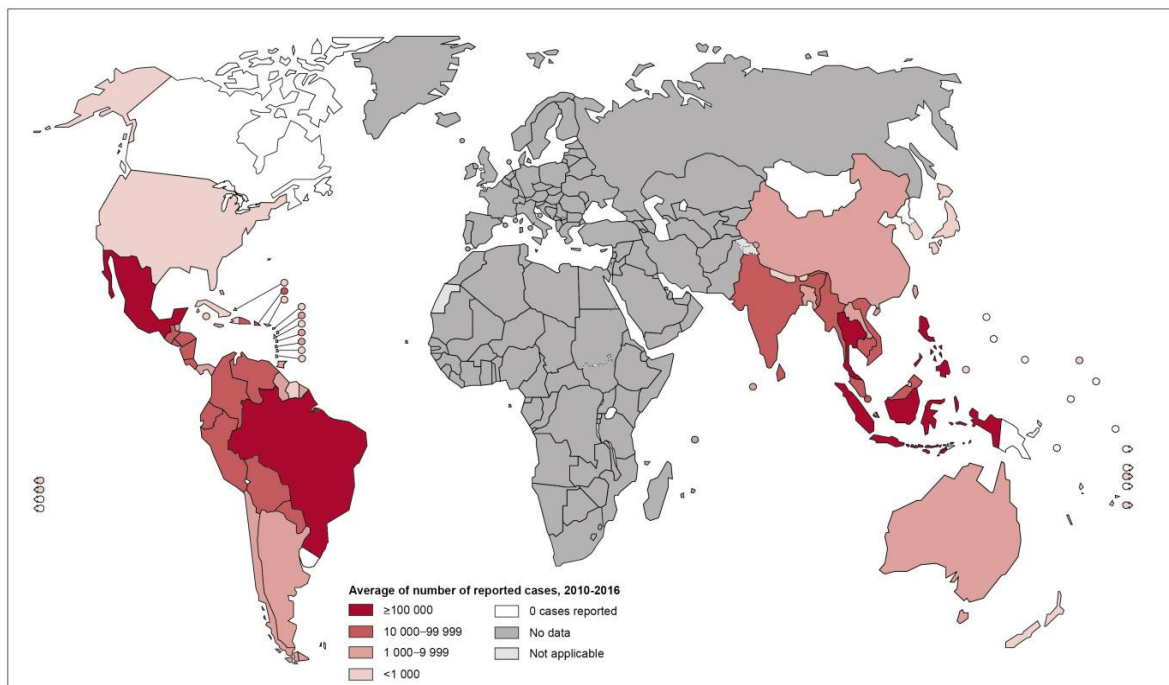


Figura 8: Número médio de casos de dengue suspeitos ou confirmados reportados a OMS entre 2010-2016

Fonte: WHO, 2007. Disponível em: www.WHO.int/denguecontrol/epidemiology/en/

Países europeus como França e Croácia reportaram casos de transmissão local da dengue em 2010 e outros três países da mesma região reportaram casos de doença importada (WHO, 2017). Em 2012 mais casos importados de dengue foram reportados em onze países europeus que inclui Portugal com cerca de 2 mil casos.

Em 2014 foi registado um aumento no número de casos reportados na China, Fiji, Malásia e Vanuatu. No mesmo ano foram reportados casos de dengue no Japão, 70 anos depois do último reporte de caso, e a Índia destacou-se em 2015 pelo registo do pior surto de dengue (mais de 15 mil casos) nove anos após o último caso (WHO,

2017). Em África foram registados surtos de dengue na Tanzânia (Vairo *et al.*, 2014) e Moçambique (Massangaie *et al.*, 2016).

O aumento global de surtos de dengue marcaram o ano de 2016, sendo reportados somente nas Américas 2.338,848 casos prováveis, 4,274 casos de dengue grave e 1032 mortes. Já em 2017, até o mês de junho, o número de casos prováveis ultrapassa 250mil com 834 casos graves e 135 óbitos (PAHO, ???). Nas Ilhas Salomão, foi reportado, no mesmo ano um surto de dengue com mais de 7mil casos suspeitos. Em Borkina Faso foi reportado um surto de dengue com 1061 casos prováveis (WHO, 2017).

Dados actualizados pela OMS em Abril de 2017 sugerem que apesar do fraco reporte de casos e do subdiagnóstico da dengue há um aumento na incidência global da doença nas últimas décadas. Anualmente, são registados cerca de 390 milhões de casos de infecção pelo DENV. Destes, 96 milhões desenvolvem a doença com ou sem manifestações severas. De acordo com as estimativas da Organização Mundial da Saúde cerca 3.9 bilhões de indivíduos vivem em 128 países com risco de ocorrência da infecção pelo DENV. Uma análise sobre o número de casos de dengue reportados entre 2010-2015 sugere um aumento em 1milhão de casos reportados (de 2.2milhões para 3.2milhões) assim como na hiperendemicidade dos serotipos nas áreas de risco (WHO,2017)

Vários factores contribuíram para que a dengue se tornasse endêmica em países das regiões tropicais e subtropicais através da propagação do vírus e do vector, tais como: urbanização massiva não planificada, fraco abastecimento de água potável, descarte inadequado de resíduos sólidos e não biodegradáveis, aumento da taxa de viagens e migrações, temperatura, fraco sistema de saúde de controlo e altas taxas de pobreza (Gubler, 1998; Guzmán *et al.*, 2006; Amarasinghe *et al.*, 2011).

1.10.1. Dengue na África

A dengue foi inicialmente reportada na África nos finais do século XIX e início do século XX, contudo dados sobre a vigilância da dengue referente ao século passado são escassos (Amarasinghe *et al.*, 2011).

O continente africano apresenta riscos para ocorrência da dengue , pois já foi comprovada a circulação de mosquitos do gênero *Aedes* e acredita-se que seja o ponto de origem do vector (Amarasinghe *et al.*, 2011; Bhatt *et al.*, 2013; WHO, 2014). Antes de 1980 pouco se sabia sobre a circulação do vírus em África, contudo os quatro serotipos já foram isolados (DENV-2 foi o mais reportado) e estão envolvidos em ciclos silvestres (Gubler, 1998; Amarasinghe *et al.*, 2011).

Houveram relatos de dengue e doenças similares à dengue em Zanzibar (1823; 1870), Burkina Faso (1925), Egipto (1887; 1927), África do Sul-Durban (1926-1927), Senegal (1927-1928), Ilhas Reunião (1977-1978) e Seychelles (1977-1979) (Gubler *et al.*, 2014; Amarasinghe *et al.*, 2011), porém, o primeiro isolamento do DENV na África foi em 1960 na Nigéria a partir de amostras de pacientes febris (Carey *et al.*, 1971; Amarisinghe *et al.*, 2011).

Posterior ao ano de 1980, autores como Johnson *et al.*, (1982) e Kanesa-Thasan *et al.*, (1994) descreveram surtos de dengue no Leste e Oeste Africano. Pode-se citar o registo da dengue em Kenya (1982), Moçambique (1985), Djibouti (1991-1993), Somália (1982; 1993), Comoros (1992-1993), Arabia Saudita (1994) e Ilhas do Cabo Verde (2009) (Gubler e Clark, 1995; Amarisinghe *et al.*, 2011). As epidemias de 1991 em Djibouti e 1994 na Arabia Saudita constituíram as maiores epidemias de dengue em África.

Segundo Amarasinghe e colaboradores (2011), dados sobre a prevalência e incidência da dengue na África são escassos, mas um estudo na Nigéria determinou uma prevalência da infecção por flavivírus em torno de 1.816 em crianças e adultos de áreas rurais e urbanas entre 1970 (Fagbami *et al.*, 1977).

Entre 1960-2010 a transmissão da dengue alastrou-se na África com mais de 34 países reportando epidemias. Destes, 22 reportaram a transmissão local da doença sendo 20 confirmados por laboratório e outros 2 (Egito e Zanzibar) apenas registos de casos clínicos. Para outros 12 países há relatos da dengue em viajantes retornando da África para países não endêmicos (Amarasinghe *et al.*, 2011).

Apesar dos dados acima citados a real situação epidemiológica de África ainda não é clara devido a diversos factores, a citar: o subdiagnóstico da dengue como malária ou febre de origem desconhecida, falta de programas de vigilância e falta de

capacidade para confirmação laboratorial dos casos suspeitos (Amarasinghe *et al.*, 2011).

África é considerado local de origem do vector *Aedes aegypti* e de posterior dispersão do mesmo para outras áreas tropicais mas, apesar da circulação deste e de outros potenciais vectores como *Aedes albopictus*, *Aedes africanus* e *Aedes luteocephalus* estudos referem uma baixa susceptibilidade relativa dos vectores africanos aos serotipos e genótipos dos DENV (Gubler e Clark, 1995; Halstead, 2008; Amarasinghe *et al.*, 2011). Este facto também pode contribuir para a baixa prevalência da dengue em África (Amarasinghe *et al.*, 2011).

Países africanos focam no controle do vector como forma de prevenção da doença, mas ainda são necessários esforços para a implementação da vigilância da situação epidemiológica no continente.

1.10.2. Dengue em Moçambique

O primeiro caso de dengue pelo DENV-3 em África foi registado em Moçambique na Província de Cabo Delgado (Pemba) entre os finais de 1984 e início de 1985 (Abreu *et al.*, 1985; Gubler *et al.*, 1986). Para Moçambique este foi o primeiro caso reportado de dengue e acometeu cerca de 45% da população, contudo pouco se sabe sobre a origem do vírus e genótipos circulantes. Acredita-se que a migração de ou para países como Índia, Sudeste Asiático e regiões do Pacífico onde o vírus era endêmico no mesmo período constituam o principal factor associado à circulação deste serotipo no país (Gubler, 1986).

Entre abril e maio de 2014 foi reportado um surto (243 suspeitos e 77 confirmados) de dengue pelo vírus DENV-2 em Cabo Delgado (Pemba) e Nampula (NICD, 2014; WHO, 2015b). O DENV-2 tem sido reportado como maior causador da dengue em África, seguido pelo DENV-1 (Sang, 2006; WHO, 2009). Este constitui o segundo surto de dengue em Pemba, após 29 anos após o primeiro surto ter sido identificado (Higa *et al.*, 2015), sendo de serótipo distinto. Pemba é uma zona turística e faz fronteira com Tanzânia, país onde foi registado surto de dengue em 2010 (NICD, 2014; WHO, 2015b) e em 2014 (WHO, 2015b). Mais uma vez, a migração está sendo implicada como factor

para a ocorrência da dengue (Gubler, 1998), além de Moçambique constituir zona de risco devido à presença de factores determinantes como a presença do vector (WHO, 2014) e queda de chuvas que proporciona criadouros para mosquitos (NICD, 2014). Higa e colaboradores (2015) confirmaram a circulação do principal vector *Aedes* em Pemba, Nampula e Nacala durante o surto de dengue em 2014.

1.11. JUSTIFICATIVA

O primeiro relato de dengue em Moçambique foi entre 1984-1985 (Gubler, 1986) e, mais recentemente, 2014 foi registado um surto pelo DENV-2 (Massangaie et al., 2016). A falta de dados de epidemiologia molecular referentes ao primeiro surto de dengue no país dificulta até certo ponto a avaliação do impacto da emergência de um serotipo diferente.

O reconhecimento dos genótipos do DENV e suas origens fornecem informações para que se possam monitorar os genótipos mais virulentos na vigência de epidemias auxiliando na adoção das medidas de controle. Esses estudos podem também ajudar no esclarecimento da patogênese do DENV e nos mecanismos associados à resposta imune do hospedeiro, bem como, o entendimento da influência do vetor na seleção das variantes genéticas.

Estudos de epidemiologia molecular podem constituir uma importante ferramenta para identificar a origem dos vírus circulantes no país, monitorar a introdução, dispersão e recombinação dos vírus, bem como prever as possíveis consequências epidemiológicas de tais eventos.

O presente estudo pretende fornecer a caracterização molecular dos DENV, associados aos casos registrados entre 2014 e 2015, nas províncias de Cabo Delgado e Nampula, Moçambique, como serotipo e genótipo circulante, visto a importância para a vigilância epidemiológica que estas informações conferem, principalmente em uma localidade onde não existem informações disponíveis. Tais informações servirão de auxílio em investigações de casos de dengue, possíveis padrões evolutivos, introduções, propagação dos vírus, filogeografia e previsão de futuras consequências epidemiológicas. Nossos dados pioneiros sobre a caracterização molecular e

filogenética dos DENV circulantes em Moçambique, poderão ajudar no desenho de estratégias de controlo da doença que fortaleçam o sistema de vigilância da dengue no país.

2. OBJECTIVOS

2.1. Objectivo Geral

- Monitorar os serotipos e genótipos do vírus dengue circulantes no norte de Moçambique entre 2014 a 2016.

2.2. Objectivos Específicos

- Monitorar a ocorrência dos DENV no período pós-surto de 2014;
- Monitorar e comparar as características clínico-demográficas dos pacientes com Dengue no período de 2014 a 2016;
- Identificar os genótipos do DENV envolvidos no surto de Pemba e Nampula de 2014;
- Identificar os serotipos e genótipos do DENV circulantes em Pemba e Nampula no período pós-surto (2015 e 2016);
- Correlacionar os genótipos e serotipos do DENV circulantes em Nampula e Pemba com as características clínicas e demográficas dos pacientes;
- Comparar os genótipos circulantes em Moçambique com os genótipos do DENV circulantes em outras regiões do mundo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

O presente estudo foi considerado parte da vigilância de arboviroses no país para o qual se obteve aprovação ética do Comité Nacional para Bioética para Saúde (CNBS) com o número IRB00002657. Para garantir a confidencialidade dos pacientes, as amostras foram tratadas de forma cega usando-se apenas o código atribuído a quando da colheita da amostra.

3.2. Desenho e área do estudo

O presente estudo é de carácter transversal e consistiu na monitoria da ocorrência do DENV e avaliação dos serotipos e genótipos nos dois anos subseqüentes a ocorrência do surto de Dengue nas províncias de Nampula e Pemba em 2014 (Figura 9). As amostras colhidas no âmbito da investigação do surto de dengue registado no Norte de Moçambique (Províncias de Nampula e Cabo Delgado-Pemba) em 2014 foram utilizadas como linha de base para comparação com os anos de 2015 e 2016. O período pós- surto reportado neste estudo é de janeiro de 2015 a dezembro de 2016.



Figura 9: Locais de ocorrência do surto de dengue registado em Moçambique no ano de 2014. (Massangaie *et al.*, 2016).

A cidade de Pemba tem aproximadamente 102 km² e uma população constituída por aproximadamente 172.572 habitantes, tem uma temperatura média de 25,1°C (16,1°C- 33,5°C), uma precipitação média mensal de 84,2 mm e 74,1% de humidade relativa (Instituto Nacional de Estatística-INE, 2013).

A cidade de Nampula tem 334 km², possui aproximadamente 571.284 habitantes, uma temperatura média de 25,0 °C (13,7°C- 37,7°C), precipitação média mensal de 130,5 mm e 63,2% de humidade relativa (INE, 2013).

3.3. Definição de Caso

Durante a investigação do surto de dengue registado entre março a junho de 2014 foram colhidas 193 amostras (Massangaie *et al.*,2016) de pacientes com suspeita de infecção pelo DENV. Após a investigação do surto, foi implementada a vigilância pós-surto entre janeiro de 2015 a dezembro de 2016, tendo sido colhidas um total de 366 amostras. Eram considerados suspeitos de infecção pelo DENV, pacientes atendidos no Hospital Central de Nampula (HCN) e Hospital Provincial de Pemba (HPP) com síndrome febril aguda (temperatura axilar >37.5°C), com resultado negativo

para malária e com dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, artralgia e rash.

As amostras seguiram os fluxos de testagem descritos nas Figuras 10, 11, 12 e 13. Foram considerados como casos positivos, os casos com resultado positivo no teste ELISA para detecção de anticorpos NS1 e/ou com resultado positivo no diagnóstico molecular por PCR. Foram, também considerados casos positivos os casos cujas amostras foram duplamente positivas nos testes serológicos para detecção do antígeno NS1 e de anticorpos IgM. As amostras positivas apenas no teste ELISA para detecção de anticorpos IgM foram considerados casos prováveis de infecção pelo DENV. Amostras positivas no teste ELISA para detecção de anticorpos IgG ou com resultado negativo em todas as testagens foram considerados casos negativos.

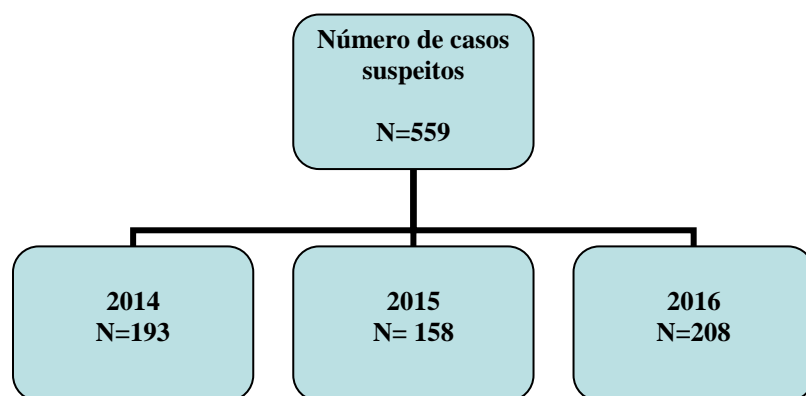


Figura 10: Número de casos suspeitos identificados durante as investigações de surto (2014) e pós surto (2015 e 2016)

3.4. Preparação e transporte de amostras

Todas as amostras de sangue total suspeitas de infecção por dengue foram centrifugadas para separação do soro nas unidades sanitárias. As amostras de soro foram armazenadas a -20°C até a data em que foram transportadas em caixas térmicas com acumuladores de frio para o Laboratório de Isolamento Viral (LIV) do Instituto Nacional de Saúde (INS) em Maputo.

No LIV, as amostras foram submetidas a testes serológicos e moleculares para confirmação do diagnóstico inicial. Todas as amostras identificadas por métodos moleculares foram posteriormente enviadas ao Brasil para sequenciamento genético.

3.5. Determinação de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA)

A determinação de anticorpos IgM anti-Dengue foi realizado utilizando o kit Panbio Dengue IgM Capture ELISA (Brisbane, Austrália), segundo as instruções fornecidas pelo fornecedor.

3.6. Determinação de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA)

Para a detecção de anticorpos IgG anti-dengue, foi realizado o ensaio imunoenzimático Dengue ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG anti- DENV (PanBio Diagnostics, Brisbane, Austrália) considerando as instruções dadas pelo fabricante.

3.7. Determinação de antígenos NS1 (Ag-ELISA)

A detecção de antígenos NS1 do DENV é importante para identificação dos casos agudos antes do aparecimento dos anticorpos IgM. Para a detecção de antígenos NS1 foi utilizado o kit de ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, França) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

3.8. Extração do RNA viral

O RNA genômico viral foi extraído de cada amostra de soro (140ul) usando o mini kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, Inc., Alemanha) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O material extraído foi conservado a -70°C até a altura de uso.

3.9. Reacção em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

As amostras de soro colhidas durante a investigação do surto em 2014 foram testadas no National Institute of Communicable Diseases (NICD), África do Sul e no Laboratório de Isolamento Viral (LIV) do Instituto Nacional de Saúde. No LIV as amostras foram testadas por qRT-PCR usando o protocolo CDC DENV-1-4 Real-Time RT-PCR em equipamento ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) (Figura 11).

Em relação às amostras colhidas em 2015, todas foram testadas no LIV usando o protocolo descrito acima (Figura 12) e as colhidas em 2016 foram testadas usando o protocolo referido na figura 13.

Para genotipagem, foram seleccionadas amostras do surto ocorrido em 2014 e amostras do período pós- surto correspondentes a 2015 e 2016, colhidas em Pemba e Nampula cujo resultado seja positivo pelo teste molecular (RT-PCR) no NICD, no LIV e na Suécia e cujo volume disponível no biobanco do LIV era igual ou superior 300uL (mínimo necessário para a testagem molecular, principalmente em para casos em que houver necessidade de repetir a extracção).

Assim, um total de 64 amostras colhidas em 2014 (34) e 2015 (30) foi encaminhado para o Brasil, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-IOC), Laboratório de Flavivírus, para genotipagem e análise filogenética (Figura 11 e 12).

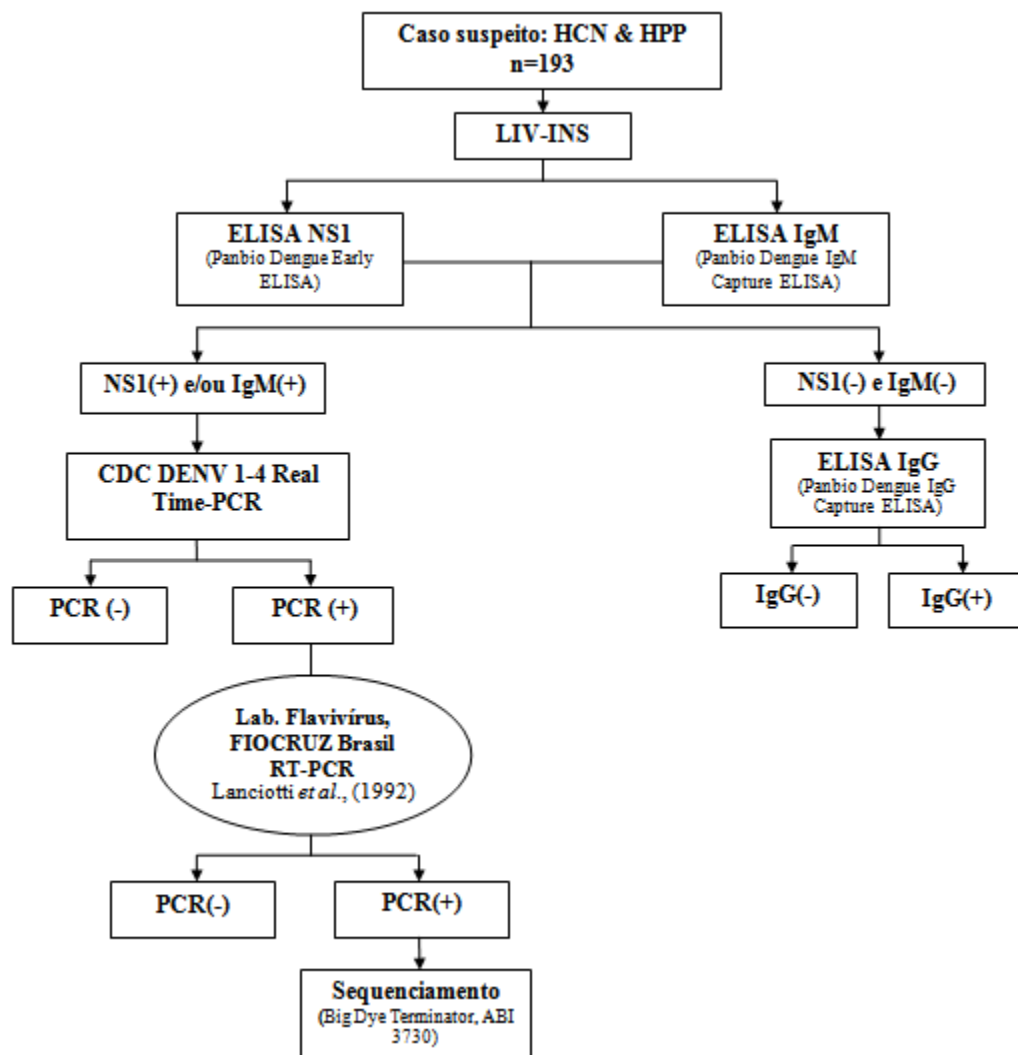


Figura 11: Fluxograma de testagem das amostras colhidas em 2014 (durante a investigação do surto de dengue em Moçambique (adaptado de Massangaie *et al.*, 2016). Real Time-PCR realizado no âmbito da instalação da plataforma de diagnóstico molecular de arboviroses no LIV.

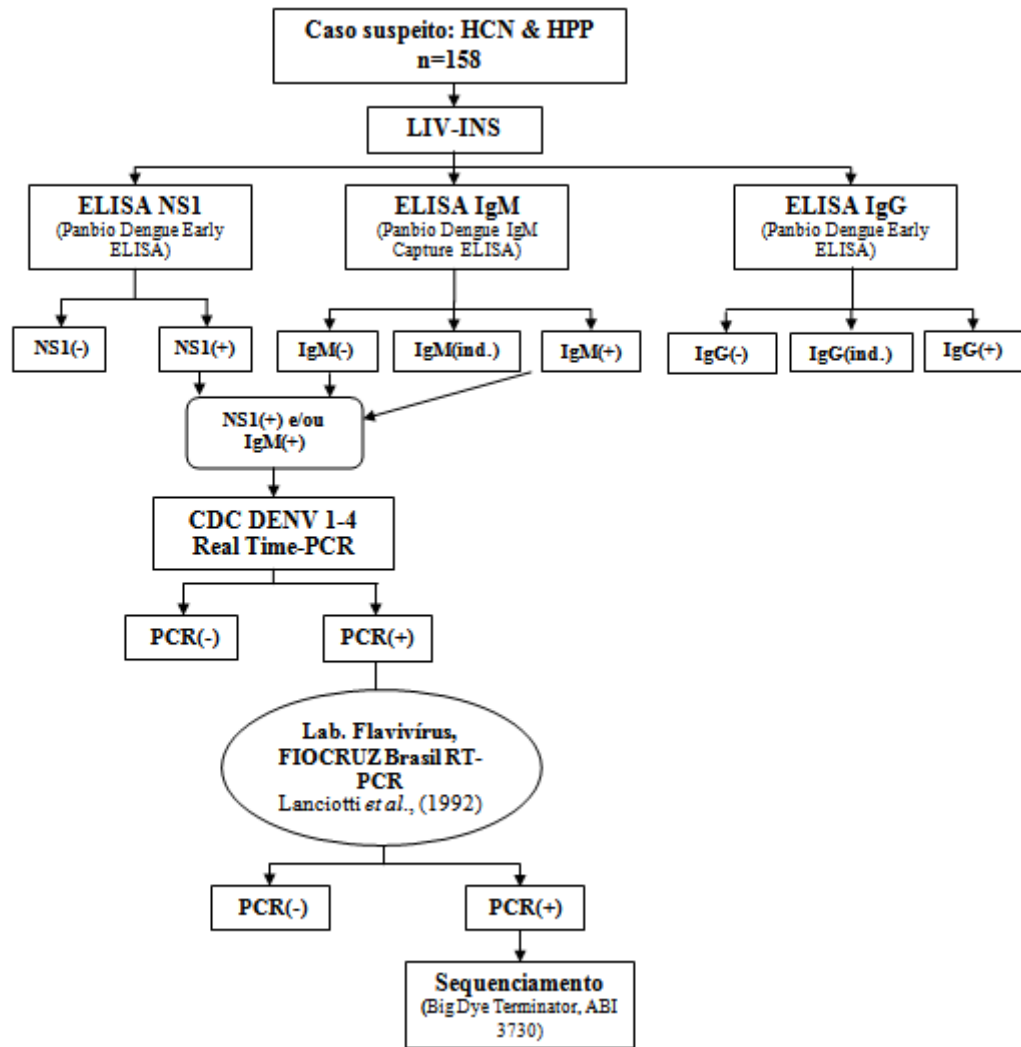


Figura 12: Fluxograma de testagem das amostras colhidas em 2015 (investigação pós-surto de dengue em Moçambique).

Amostras colhidas em 2016 com resultado positivo para o antígeno NS1, foram encaminhadas para o *Public Health Agency of Sweden Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm*, na Suécia para confirmação e tipagem por RT-PCR. Neste laboratório, foi usado o protocolo *One-Step real-time RT-PCR assay* descrito por Alm *et al.*, 2015 (Figura 12). Amostras positivas no RT-PCR (n=2) foram seleccionadas para genotipagem, no mesmo laboratório.

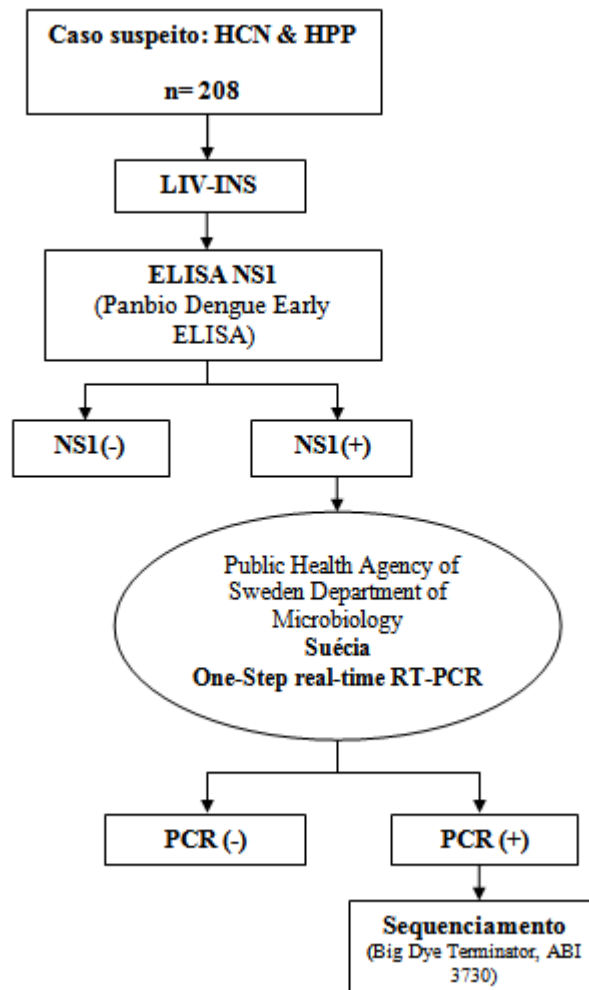


Figura 13: Fluxograma de testagem das amostras colhidas em 2016 (investigação pós surto)

3.10. RT-PCR para serotipagem

Para a detecção e tipagem dos DENV a partir de amostras de soro foi usado o RT-PCR baseado na metodologia descrita por Lanciotti *et al.* (1992). Neste procedimento as amostras são testadas simultaneamente para os quatro serotipos em um procedimento *semi-nested*, gerando produtos amplificados (*amplicons*) com tamanhos específicos em pares de bases (pb) para cada um dos sorotipos dos DENV.

Em uma primeira etapa, foram utilizados iniciadores consenso (D1 e D2), que hibridizam um fragmento entre os genes C e prM, dos quatro sorotipos. Em uma segunda etapa *semi-nested*, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores dengue-

específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para detectar o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-PCR para a serotipagem dos DENV (Lanciotti *et al.*, 1992)

Primer	Seqüência	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (em pares de base [pb])
D1 (+)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3'	134-161	511
D2 (-)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	616-644	-
TS1 (-)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3'	568-586	482 (D1 + TS1)
TS2 (-)	5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'	232-252	119 (D1 + TS2)
TS3 (-)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3'	400-421	290 (D1 + TS3)
TS4 (-)	5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	506-527	392 (D1 + TS4)

O RNA extraído foi transcrito reversamente em cDNA (42°C/60 minutos) em uma primeira etapa e as condições de termociclagem para a amplificação do DNA consistiram de 35 ciclos de desnaturação (94°C/35 segundos), anelamento (55°C/1 minuto) e extensão (72°C/2 minutos), seguido de uma etapa de extensão final (72°C/5 minutos). Para serotipagem dos DENV, os produtos obtidos na primeira etapa foram diluídos (1/100) em água isenta de nucleases e submetidos a 18 ciclos de desnaturação (94°C/30 segundos), anelamento (55°C/1 minuto) e extensão (72°C/2 minutos), concluindo com uma etapa de extensão final (72°C/5 minutos). Após, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1.5% acrescido de 5µL de brometo de etídeo (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) por 60 minutos a 100V e visualizados em luz ultravioleta.

3.11. RT-PCR para sequenciamento genómico

O RNA viral extraído foi amplificado em uma etapa única de acordo com protocolo descrito por dos Santos *et al.*, (2002), utilizando primers sense D2-4A – 5'GGA TCC CTG GGA GGA GTG TT-3' e primer antisense D2-4B – 5'- TCC ATT GCT

CCA GAG GGT GT-3'descrito por Faria *et al.*, (2013). Em um tubo tipo *ependorf* foram adicionados 45 µL da mistura para a RT-PCR (Tabela 3) e acrescentados 5 µL de RNA extraído. Os tubos foram imediatamente colocados no bloco aquecido do termociclador (GeneAmp modelo 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para a realização da transcrição reversa e amplificação. As condições de termociclagem consistiram de um ciclo de transcrição reversa a 42^o C/60 min, seguido de quarenta ciclos de desnaturação (30 seg/94 °C), hibridização (1 min/63 °C) e extensão (2 min/72 °C), com uma extensão final de 10 min/72^oC.

Tabela 3: Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para amplificação do gene E/NS1 dos DENV-2.

Reagentes	Volume
Água livre de nucleases (Promega Corporation, Madison, EUA)	14 µl
Iniciador Sense D2-4A (10µM)*	2,5 µl
Iniciador Antisense D2-4B (10 µM)*	2,5 µl
5 U/µl enzima AMV-RT (Promega Corporation, Madison, EUA)	1 µl
Accessquick Master Mix™ (2x) (Promega Corporation, Madison, EUA)	25 µl
Volume final	45µl

*Faria *et al.*, 2013.

Para a análise dos amplicons, 10µl do produto amplificado acrescido com 1µl de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) foi aplicado em gel de agarose (Invitrogen, EUA) a 1% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5 X, acrescido de 5µL de brometo de etídio (10 mg/mL) (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) e foi realizada eletroforese à 100V por 60 minutos onde os amplicons foram visualizados em

transiluminador com luz ultravioleta e a imagem foi registada em captador de imagens Biorad, EUA.

3.12. Purificação e quantificação do DNA

O produto de DNA amplificado foi purificado utilizando o Kit comercial “PCR Purification” (QIAGEN, Inc., California, EUA) na presença de fragmento amplificado único ou “Gel extraction” (QIAGEN, Inc., California, EUA), quando apresentou fragmentos inespecíficos, além do alvo. Os protocolos foram realizados de acordo com a descrição do fabricante.

Os produtos purificados foram quantificados por electroforese em gel de agarose a 2%, com 5µL de brometo de etídio (10mg/mL) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) utilizando marcador Low Mass DNA (Invitrogen, Califórnia, EUA), e o gel foi visualizado em luz ultravioleta.

3.13. Reação de sequenciamento

Os fragmentos de cDNA amplificados e purificados foram sequenciados em ambas direcções, utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction versão 3.1 (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA) na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde os produtos passaram por electroforese capilar em analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems®, California, EUA) (Otto *et al.*, 2008).

3.14. Análise filogenética

Sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas através do programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). O programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi usado para determinar a identidade das sequências. As mesmas foram posteriormente alinhadas através do software CLUSTAL OMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A árvore filogenética foi gerada usando o software MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>), método *Neighbor-Joining* e modelo *Kimura II parâmetro* (de acordo com o teste de melhor modelo em *Model Test*). Foi também considerado o valor de 1000 réplicas para o bootstrap.

3.15. Sequências do Genbank para estudos comparativos e análise filogenética

Para estudos comparativos e análise filogenética foram utilizadas sequências de DENV disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), representantes dos genótipos de DENV-2 e cepas representantes de DENV-1, DENV-3 e DENV-4 para utilização como grupo externo (Tabela 4).

Tabela 4: Descrição das sequências de referência obtidas no genbank para análise filogenética.

País de origem	Ano	Serótipo	Genótipo	Código de acesso no Genbank
Tanzânia	2014	DENV-2	Cosmopolita	KT288901.1
Vietname	2006	DENV-2	Cosmopolita	EU482640.1
Indonésia	1975	DENV-2	Cosmopolita	GQ398263.1
China	2010	DENV-2	Cosmopolita	KP723479.1
China	2014	DENV-2	Cosmopolita	KP723478.1
China	2010	DENV-2	Cosmopolita	JX470186
Indonésia	1976	DENV-2	Cosmopolita	GQ398264.1
Indonésia	1973	DENV-2	Cosmopolita	M32951.1
Indonésia	1998	DENV-2	Cosmopolita	AB189124.1
Indonésia	2004	DENV-2	Cosmopolita	AY858036.2
China	1989	DENV-2	Asiático I	AF204177.1
Papua Nova Guiné	1944	DENV-2	Asiático I	AF038403.1
China	1985	DENV-2	Asiático II	AF119661.1
Venezuela	1990	DENV-2	Sudeste Asiático	GQ868540.1
Brasil	1998	DENV-2	Sudeste Asiático	AF489932.1
Jamáica	1983	DENV-2	Sudeste Asiático	M20558.1
República Dominicana	2001	DENV-2	Sudeste Asiático	AB122022.1

Porto Rico	2005	DENV-2	Sudeste Asiático	EU687216.1
Nicarágua	2007	DENV-2	Sudeste Asiático	GQ199868.1
Nicarágua	1999	DENV-2	Sudeste Asiático	GQ199895.1
Porto Rico	1977	DENV-2	Americano	EU056812.1
México	1992	DENV-2	Americano	AF100469.1
Perú	1995	DENV-2	Americano	AF100467.1
Senegal	1999	DENV-2	Selvagem	EF457904.1
Moçambique	1985	DENV-3		FJ882575.1
Japão	1943	DENV-1		AB074760.1
(Mochizuki)				
China	2000	DENV-4		AF289029.1

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais dos casos de Dengue identificados durante o surto e no período de vigilância pós-surto

4.1.1. Ano de 2014

Um total de 193 casos suspeitos foram reportados entre março a junho de 2014 nas províncias de Cabo Delgado (Cidade de Pemba) e Nampula (Cidade de Nampula) (figura 11). Todas as amostras foram testadas para detecção de antígenos NS1 e detecção de anticorpos IgM. Um total de 100 (100/193-51.8%) amostras foram positivas nos testes serológicos (NS1 e/ou IgM). As restantes amostras 93 (93/193-48.2%) negativas em ambos testes NS1 e IgM e foram testadas para detecção de anticorpos IgG e destas, 6 (6/93-6.5%) foram positivas e 87 (87/93-93.5%) foram negativas.

Considerando a disponibilidade de reagentes para testagem molecular, foram testadas 93 das 100 amostras positivas por serologia (NS1 e/ou IgM) usando o protocolo CDC DENV 1-4 Real Time-PCR. Destas, 37 (37/93-39.8%) foram confirmadas por RT-PCR, sendo que 3 foram confirmadas por RT-PCR no NICD, África do Sul (Massanagie *et al.*, 2016) e as restantes 34 foram confirmados também por RT-PCR no LIV no âmbito da instalação da plataforma de testagem molecular de arboviroses

4.1.2. Ano de 2015

Entre janeiro a dezembro de 2015 foram colhidas amostras de 158 pacientes suspeitos de infecção pelo DENV (figura 12). Das 158 amostras, apenas 115 (72.8%) foram testadas para detecção do antígeno NS1. Destas, 58 foram positivas (58/115-50.4%) e 57 amostras foram negativas (57/115-49.5%). As 43 amostras restantes não foram testadas para a detecção de antígenos NS1 devido à indisponibilidade de reagentes para o efeito.

A detecção de anticorpos IgM foi realizada para 154 amostras e destas, 57 (37%) foram positivas, 91 (59.1%) foram negativas e 6 (3.9%) foram indeterminadas. As restantes 4 amostras não foram testadas para detecção de anticorpos IgM devido a indisponibilidade de reagentes para serem realizados.

A detecção de anticorpos IgG foi realizada em 154 das 158 amostras. Destas, 27 (17.5%) foram positivas, 123 (79.9%) foram negativas e 4 (2.6%) foram indeterminadas. As restantes 4 não foram testadas para detecção de anticorpos IgG devido a indisponibilidade de reagentes para serem realizados.

Um total de 102 amostras foram positivas para NS1 e/ou IgM, destas, 45 (44.1%) foram positivas somente por NS1, 44 (43.1%) foram positivas apenas para IgM e 13 (12.7%) foram duplamente positivas para NS1 e IgM. As amostras que foram positivas por métodos serológicos foram testadas usando o protocolo CDC DENV 1-4 Real Time-PCR para confirmação molecular que resultou em 40 (80%) amostras positivas. As restantes, 52 amostras, não testadas por RT-PCR correspondiam a 44 amostras com resultado de NS1- negativo e IgM positivo e 8 amostras com NS1 positivo e IgM negativo.

Assim, de acordo com a definição de caso descrita no ponto 4.3, um total de 58 (36.7%) amostras foram consideradas positivas das quais 40 por RT-PCR e 18 por detecção de antígenos NS1. Além disso, 44 (27.8%) casos prováveis de infecção obtiveram resultado de IgM positivo) e 56 (35.5%) casos com resultado negativos ou sem resultado (positivas apenas para IgG ou negativos em todas as testagens serológicas) (Tabela 5).

A maior parte dos casos suspeitos de 2015, era provenientes do HCN (n=98). No HPP foram identificados 60 (38%) casos suspeitos. Em relação ao sexo e idade, a maioria dos casos suspeitos era do sexo feminino (n=70) e com idade entre 21-40 (n=44) anos de idade respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5: Informações dos casos suspeitos de infecção pelos DENV identificados em 2015 durante a vigilância pós-surto de dengue em Moçambique

Característica	Descrição	Casos	Casos	Casos	Total n=158
		Positivos n= 58 (36.7%)	Prováveis n= 44 (27.8%)	Negativos/SR# n= 56 (35.4%)	
Proveniência	Nampula	49 (84.5%)	24(54.5%)	25 (44.6%)	98 (62.0%)
	Pemba	9 (15.5)	20 (45.5%)	31 (55.4%)	60 (38.0%)
Sexo	Feminino	25 (43.1%)	18 (51.6%)	27 (48.2%)	70 (44.3%)
	Masculino	18 (31%)	26 (48.4%)	23 (41.1%)	67 (42.4%)
	SI*	15 (25.9%)		6 (10.7%)	21 (13.3%)
Idade	0-20	4 (6.9%)	16 36.4%)	9 (16.1%)	29 (18.4%)
	21-40	15 (25.9%)	8 (18.2%)	21 (37.5%)	44 (27.8%)
	41-60	3 (5.2%%)	6 (13.6%)	12 (21.4%)	21 (13.3%)
	>60		1 (2.3%)	1 (1.8%)	2 (1.3%)
	SI*	36 (62.1%)	13 (29.5%)	13 (23.2%)	62 (39.2%)

#SR- Sem resultado

*SI- Sem informação

4.1.3. Resumo dos resultados de PCR de 2014 e 2015

Um total de 143 amostras (93 colhidas em 2014 e 50 colhidas em 2015) foi submetido a confirmação por RT-PCR e destas, apenas 77 (37 de 2014 e 40 de 2015) foram positivas. Considerando o volume de amostra disponível no biobanco do LIV (igual ou superior 300uL), 64 destas 77 amostras positivas por PCR (34 de 2014 e 30 de 2015) foram enviadas para o Brasil, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-IOC), Laboratório de flavivírus, foi possível reconfirmar o resultado anterior e serotipar 41 amostras (18 de 2014 e 23 de 2015) das 64 seleccionadas, contudo a taxa de sucesso em genotipagem foi de 14.6% (6/41) das quais 3 das 18 amostras de 2014 e 3 das 23 amostras de 2015.

4.1.4. Ano de 2016

Em 2016, foram colhidas 208 amostras de pacientes suspeitos de infecção pelo DENV entre os meses de janeiro a dezembro no âmbito da investigação após surto de dengue no País (figura 13). As amostras foram encaminhadas ao LIV onde foram testadas apenas por ELISA para detecção de antígenos NS1. O antígeno NS1 foi detectado em 27 (13%) amostras (casos prováveis de infecção) e as demais 181 (87%) foram negativas. As amostras com resultados positivos para NS1 e cujo volume no biobanco do LIV era igual ou superior a 300uL (18/27) foram enviadas a Agência Sueca de Saúde Pública para a realização do PCR e serotipagem. A infecção pelo DENV foi confirmada em 5 amostras (27.8%) e 22 amostras obtiveram resultado positivo para NS1 e foram consideradas casos prováveis de infecção pelo DENV (Tabela 6). De acordo com a Tabela 6, maior parte dos casos suspeitos de infecção pelo DENV foi identificada no HPP (n= 185). Em relação ao sexo e idade, a maior parte dos pacientes eram do sexo feminino (n=101) e de idade entre 21-40 anos (n=104), respectivamente.

Tabela 6: Informações dos casos suspeitos identificados em 2016 durante a vigilância pós surto de Dengue em Moçambique

Característica	Descrição	Casos Postivos n= 5 (2.4%)	Casos Prováveis n=22 (10.6%)	Casos Negativos n=181 (87.0%)	Total n=208
Proveniência	Nampula		2 (9.1%)	21 (11.6%)	23 (11.1%)
	Pemba	5 (100%)	20 (90.9%)	160 (88.4%)	185 (88.9%)
Sexo	Feminino	3 (60%)	12 (54.5%)	86 (47.5%)	101 (48.6%)
	Masculino	2 (40%)	8 (36.4%)	78 (43.1%)	88 (42.3%)
	SI*		2 (9.1%)	17 (9.4%)	19 (9.1%)
Idade	0-20	2 (40%)	6 (27.3%)	65 (35.9%)	73 (35.1%)
	21-40	3 (60%)	12 (54.5%)	89 (49.2%)	104 (50%)
	41-60		3 (13.6%)	21 (11.6%)	24 (11.5%)
	>60			1 (0.5%)	1 (0.5%)
	SI*		1 (4.5%)	5 (2.8%)	6 (2.9%)

*SI-Sem informação

4.2. Serotipagem do DENV em pacientes com infecção confirmada

As amostras dos casos confirmados de infecção pelo DENV cujo volume no biobanco era superior ou igual a 300ul, foram selecionadas para a serotipagem e genotipagem. Deste modo um total de 82 amostras foi selecionado, das quais 34 (41.5%) eram provenientes dos casos identificados durante a investigação do surto de dengue em Moçambique em 2014, 30 (36.6%) identificadas durante a vigilância pós-surto em 2015 e as restantes 18 (21.9%) identificadas durante a investigação pós-surto em 2016

Como resultado da RT-PCR (Lanciotti *et al.*, 1992), apenas 41 (64.1%) amostras colhidas entre 2014 e 2015 amplificaram em torno de 120 pares de base confirmando tratar-se do DENV-2 (figura 14).

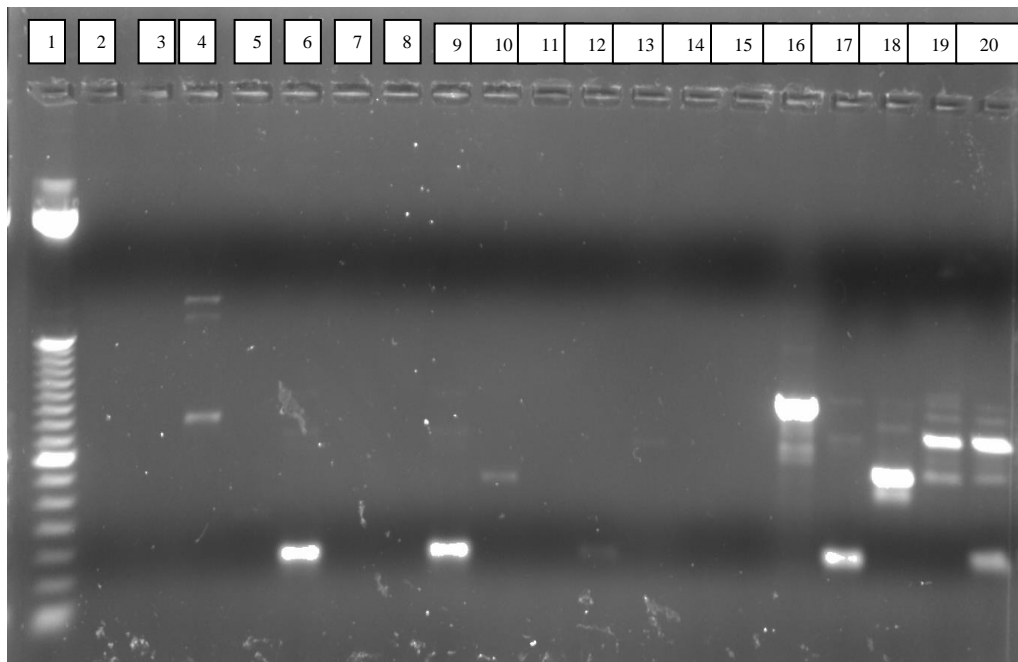


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1.5% dos produtos amplificados por RT-PCR (Lanciotti *et al.*, 1992). Poço 1: Peso molecular de 50pb; poço 6,9 e 12: DENV-2. Poços 16-20: controlos positivos dos DENV-1 a 4.

Das 18 amostras colhidas em 2016 e enviadas a Suécia para confirmação do diagnóstico por RT-PCR, apenas 5 (27.8%) foram positivas e foi identificado o DENV 2. As 5 amostras de 2016 confirmadas por RT-PCR na Suécia foram selecionadas para o sequenciamento.

4.3 Descrição da monitoria anual de casos

Depois do registo do surto de dengue em 2014, quando foram confirmados 100 dos 193 casos suspeitos, houve uma monitoria contínua durante os anos de 2015 e 2016. Nestes períodos foram identificados 158 e 208 casos suspeitos respectivamente. Destes, foram confirmados 58 e 27 casos de infecção pelo DENV (figura 15).

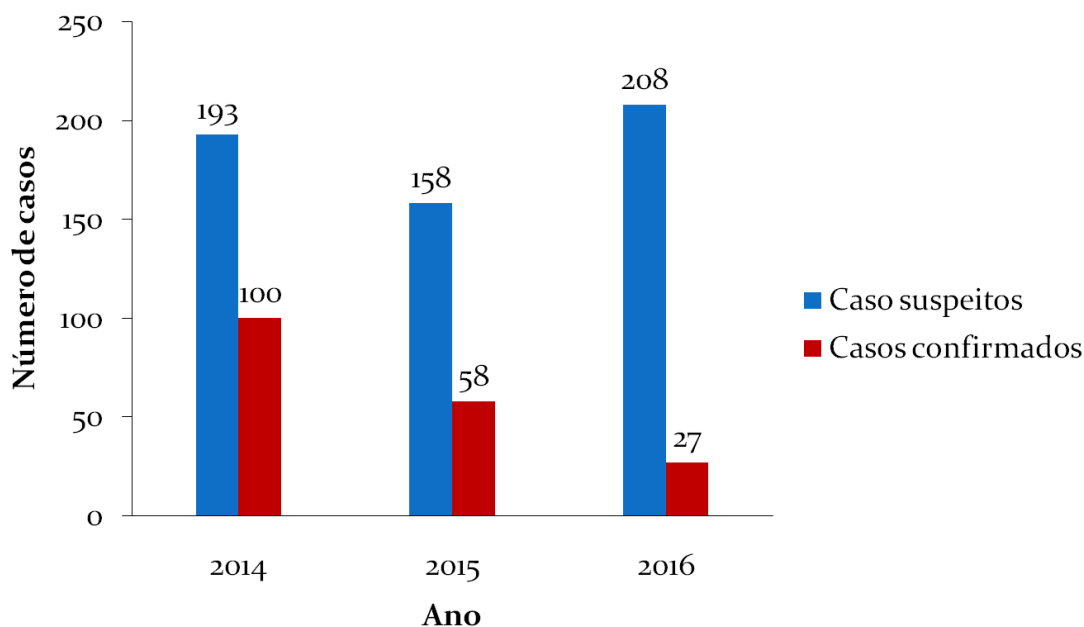


Figura 15: Representação gráfica da monitoria anual dos casos suspeitos de infecção pelo DENV

4.4. Genotipagem de DENV

Das 8 amostras genotipadas com sucesso, 3 (37.5%) foram colhidas durante o surto de dengue na Cidade de Pemba em 2014, 3 (37.5%) foram colhidas durante a investigação pós surto realizada em 2015 na Cidade de Nampula e as outras 2 (25%) foram colhidas durante a investigação pós surto realizada em 2016 na Cidade de Pemba. Com relação ao sexo do paciente, 4 das 6 amostras foram colhidas eram de pacientes do sexo feminino e as restantes 2 (33.3%) do sexo masculino. A idade destes pacientes variava de 19 a 54 anos de idade. Das 6 amostras sequenciadas, 4 (66.7%) eram de pacientes de Nacionalidade Moçambicana. Apenas 1 pertencia a um paciente estrangeiro, um paciente Chinês. Não se obteve informação sobre a Nacionalidade de 1 das amostras sequenciadas (Tabela 7).

Tabela 7: Descrição das amostras sequenciadas para genotipagem do DENV. Amostras colhidas entre 2014 a 2015 em Moçambique.

Ano	Código da amostra	Nacionalidade	Sexo	Idade (Anos)	Proveniência	Serotipo
2014	DEN11/14	Moçambicana	M	25	Pemba	DENV-2
2014	DEN18/14	Moçambicana	F	42	Pemba	DENV-2
2014	DEN44/14	Chinesa	M	19	Pemba	DENV-2
2015	FA0004/15	SI	F	54	Nampula	DENV-2
2015	FA0012/15	Moçambicana	F	26	Nampula	DENV-2
2015	FA0033/15	Moçambicana	F	41	Nampula	DENV-2
2016	FA0468/16	Moçambicana	F	22	Pemba	DENV-2
2016	FA0469/16	Moçambicana	F	10	Pemba	DENV-2

*SI- Sem informação

As sequências da junção dos genes E/NS1 foram analisadas e comparadas a 28 sequências referências disponibilizadas no banco de sequências do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A partir da análise filogenética dos 6 DENV-2 de 2014 e 2015 foi possível demonstrar que as mesmas agruparam-se com as sequências do genótipo cosmopolita (Figura 15).



Figura 16: Árvore filogenética baseada na sequência da junção dos genes E/NS1 do DENV-2 provenientes de amostras colhidas no âmbito da investigação do surto de dengue registrado em Moçambique em 2014 e de amostras colhidas no âmbito da investigação após surto de dengue em 2015 e 2016. Método Neighbor-Joining, modelo Kimura 2 parâmetros, bootstrap de 1000 pseudo-réplicas. Círculos pretos representam as sequências de DENV-2 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

No âmbito da divulgação de parte dos resultados do presente estudo, foram submetidas ao genbank 3 (50%) sequências do DENV obtidas em amostras colhidas em 2015 no âmbito da investigação após surto de dengue no país (Tabela 8).

Tabela 8: Sequências nucleotídicas da junção E/NS1 dos DENV-2 do ano de 2015 depositadas no Genbank

Código da amostras	Código de acesso o Genbank
FA0004/15	KY815103
FA0012/15	KY815104
FA0033/15	KY815105

4.5 Descrição da monitoria mensal de casos suspeitos

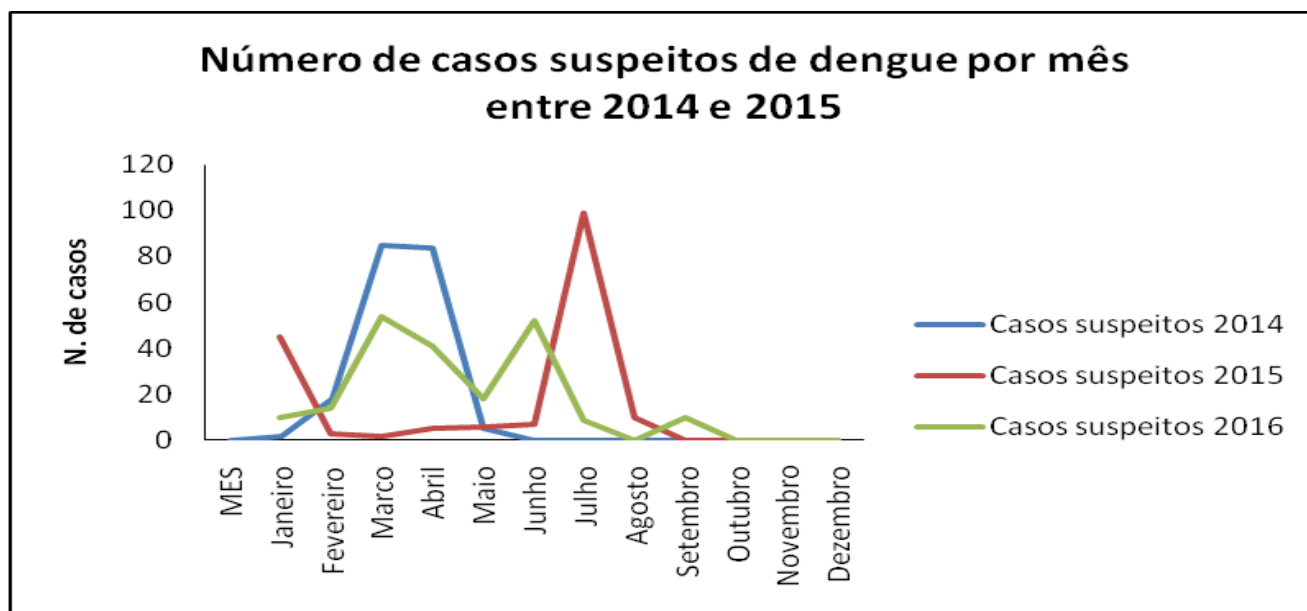


Figura 17: Representação gráfica da identificação de casos suspeitos por mês e por ano.

5. DISCUSSÃO

A dengue é hoje a arbovirose mais importante no mundo em termos de distribuição geográfica, morbidade e mortalidade. A doença é endêmica em mais de 100 países (Halstead, 2007; WHO, 2011). Moçambique é um país vulnerável a Dengue visto possuir um ambiente ideal e factores que contribuem para a transmissão e/ou dispersão do vírus, tais como: urbanização rápida e não planificada (Higa *et al.*, 2015; Massangaie *et al.*, 2016), elevada precipitação e humidade (clima tropical), elevadas trocas comerciais e culturais com países altamente endémicos ao vírus, habitações de construção precária e um fraco sistema de saneamento (Massangaie *et al.*, 2016). Estes factores contribuem também para a procriação e dispersão dos vectores da doença, cuja circulação já foi comprovada nas cidades de Pemba e Nampula durante um surto registado em 2014 (Higa *et al.*, 2015).

As condições climáticas das duas cidades fornecem o ambiente ideal para a procriação dos mosquitos vectores do DENV (Messina *et al.*, 2014; Massangaie *et al.*, 2016), que segundo Higa *et al.*, (2015) estão em maior proporção no norte do País em relação ao sul, possuem maior competência vectorial e que estes estariam provavelmente relacionados ao surto de dengue registado em 2014 em Nampula e Pemba.

Para além das condições climáticas, estas cidades são centros urbanos estratégicos com intensas trocas comerciais e culturais com outros países e regiões (INE, 2013). Estes factores podem estar associados ao registo de casos de dengue no país uma vez que as migrações são consideradas factores "chaves" para a dispersão de DENV (Weaver e Vasilakis, 2009).

Durante a investigação pós surto, foi verificada a ocorrência de casos de dengue (2015-2016) houve um aumento no número de casos suspeitos, contudo nem todos os casos foram confirmados, devido a falta de reagentes. Apesar de não se ter a confirmação laboratorial de parte das amostras, os números de casos suspeitos torna provável a endemicidade do país para dengue. Factores descritos anteriormente contribuem para tal cenário.

Segundo Massangaie *et al.*, (2016) é provável que casos de infecção pelo DENV tenham sido subdiagnosticados como malária e tratados com antimaláricos antes mesmo do registo do surto de 2014. Este facto pode ser explicado pela alta endemicidade da malária no país e falta de capacidade para discriminação clínica e laboratorial dos pacientes com síndrome febril.

Os resultados do presente estudo corroboram as suposições de Bhatt *et al.*, (2013) que referem que a dengue em África está mais dispersa recentemente apesar do fraco relato de casos. Os mesmos referem ainda que até 2016 estimava-se uma dispersão da dengue em África em torno de 16% e que estes dados eram similares aos dados da América.

Em relação à identificação de genótipos, uma das maiores limitações foi o volume insuficiente das amostras positivas disponível no biobanco do INS, com particular ênfase para as amostras do surto de dengue em Nampula em 2014. Em 2015, apenas uma amostra colhida na Cidade de Pemba e com resultado confirmatório positivo possuía o volume necessário para sequenciamento, o que resultou na baixa representatividade. O mesmo aplica-se a baixa representatividade de amostras de Nampula colhidas em 2016. O segundo importante factor responsável pelo baixo número de amostras sequenciadas é o facto de que o RNA viral não foi identificado ou a concentração identificada era baixa. Factores como a degradação do RNA durante o transporte e/ou armazenamento das amostras podem estar associados à fraca amplificação do cDNA das mesmas. Provavelmente, trate-se de amostras com baixa quantidade de vírus e/ ou colhidas após a fase aguda da infecção, que é o período recomendado para a realização de testes confirmatórios por detecção do antígeno NS1 e/ou do RNA viral (WHO, 2009; CDC, 2016).

Massangaie *et al.*, (2016) refere ainda o maior registo de casos da doença em pacientes de Nacionalidade Moçambicana e do sexo feminino, este facto pode explicar a selecção de amostras colhidas na sua maioria de pacientes Moçambicanos e do sexo feminino.

Os resultados do sequenciamento parcial da junção dos genes E/NS1 sugerem a circulação do genótipo Cosmopolita do DENV-2 tanto na Cidade de Nampula (em 2015), quanto na Cidade de Pemba (em 2014 e 2015). Este é o primeiro relato da

circulação do genótipo Cosmopolita do DENV-2 em Moçambique. Segundo Messina *et al.*, (2014), o DENV-1 é o vírus mais disperso globalmente quando comparado com os restantes serotipos e o mesmo é seguido pelo DENV-2. Os mesmos autores referem, ainda uma maior relato de casos de infecção pelo DENV-2 na Ásia e América e poucos relatos do mesmo na África subsahariana. O subdiagnóstico da infecção pelo DENV, o fraco sistema ou ausência de plataformas para relatos de casos de dengue (Bhatt *et al.*, 2013) em Moçambique e África associado a fraca capacidade clínica e laboratorial para manuseios dos casos podem contribuir para a ideia de Messina *et al.*, (2014). Já foi reportada a circulação do DENV-2 na em países Africanos como: Somália, Kenya, Angola, Gabão, Etiópia, Nigéria e Tanzânia corroborando com nossos achados.

Apesar da fraca robustez, as análises filogenéticas sugerem um agrupamento entre o DENV-2 circulante em Moçambique (em 2014 e 2015) e os vírus responsáveis pelos casos de dengue registados na Tanzânia, Vietname, Indonésia e China. Vairo *et al.*, (2016) sugeriram uma forte semelhança entre o DENV-2 responsável pelo surto de 2014 na Tanzânia e sequências isoladas em países asiáticos desde 2001, com especial atenção para as sequências isoladas na China em 2013 e 2014, corroborando com nosso estudo.

A falta de registos de casos de dengue em Moçambique pelo DENV-2, assim como a similaridade com as sequências de Tanzânia e da Ásia sugerem uma provável introdução do DENV a partir de imigrantes asiáticos. Contudo, diferente dos resultados de Vairo *et al.*, (2016) os valores de bootstrap do presente estudo não permitem assumir esta hipótese, pois os mesmos estão abaixo do mínimo aceitável (75%). O baixo valor de bootstrap pode ser justificado pelo pequeno tamanho do fragmento estudado (240 nucleotídeos). Nos estudos de epidemiologia molecular como os de Faria *et al.*, (2013), Nogueira *et al.*, (2015), Vairo *et al.*, (2016), foram sequenciados fragmentos menores (exemplo: E/NS1) de 8 amostras e um fragmento maior (exemplo: E) de nucleotídeos de 1 amostra para tornar os resultados mais confiáveis, o que não aconteceu no presente estudo. Sequência de fragmentos maiores e dados históricos sobre a circulação do mesmo serotipo no país são necessários para estudos de filogeografia, que permitem sugerir prováveis "portas de entrada".

A ausência de relato de casos de dengue antes de 2014 pode estar relacionada com o facto de que a maior parte dos pacientes com síndrome febril aguda é rotulada como sendo malária e a baixa suspeita de dengue pelos clínicos.

Em relação à ocorrência de dengue grave ou hemorrágica, nossos dados demonstram que de um modo geral os casos de dengue registados em Moçambique entre 2014 e 2016 foram na sua maioria ligeiros a moderados. De acordo com Rosen (1977) e Halstead (2012), várias são as suposições sobre os fatores que contribuem para a ocorrência da dengue grave ou hemorrágica (WHO, 2009a). Os mesmos autores referem à virulência/*fitness* (aptidão) viral como um importante fator para a ocorrência da dengue grave ou com sinais de alerta. A estirpe de DENV-2, genótipo Cosmopolita foi responsável por alguns casos de dengue grave na Tanzânia.

Diante disso, o sequenciamento do gene E e/ou genoma completo se torna cada vez mais necessário e importante para futuras análises de caracterização molecular, afim de identificar possíveis mutações ao longo do genoma que possa ter contribuído para esta diferença de cenários.

O papel da vigilância molecular contínua dos genótipos e potenciais linhagens circulantes dos DENV em Moçambique possui notável valor, uma vez que tais informações são escassas. Ressaltamos a importância de estudos como este para a vigilância dos DENV, através do qual pudemos evidenciar a presença do genótipo Cosmopolita pela primeira vez em Moçambique.

6. CONCLUSÃO

- Após o surto confirmado em 2014, o DENV tornou-se endémico no norte do país, tendo ocorrido de maneira estável nos anos 2015 e 2016;
- Todos os DENV-2 sequenciados dos anos de 2014 e 2015 pertencem ao genótipo Cosmopolita;
- A identificação do genótipo Cosmopolita do DENV-2 em Moçambique está sendo demonstrada pela primeira vez neste estudo;
- Sugere-se que o DENV-2 genótipo Cosmopolita circulante em Moçambique seja relacionado com o DENV-2 circulantes em Países Asiáticos;
- Não foram identificados casos de dengue hemorrágica ou grave entre 2014 e 2016 em Moçambique.

7. RECOMENDAÇÕES

Por se tratar do primeiro relato de casos de infecção pelo DENV e com o actual cenário climático e migratório e consequente aumento na dispersão dos DENV, é possível a ocorrência de casos de dengue grave nos próximos relatos de caso. Assim, recomenda-se que:

- O programa de vigilância dos DENV seja contínuo e com extensão para as restantes províncias do país;
- O programa deve enfatizar a monitoria dos serótipos e genótipos circulantes;
- Aumentar a capacidade clínica e técnica para identificação, relato, diagnóstico e manuseio de casos de infecção pelo DENV.

8. LIMITAÇÕES

- Falta de informações demográficas e clínicas para maioria dos casos suspeitos de infecção;
- As amostras do surto de dengue registado em Nampula no ano de 2014 não foram localizadas;
- Amostra com resultado positivo nas testagens realizadas no LIV não possuíam volume suficiente para análises moleculares para identificação de genótipos;
- A falta de alguns reagentes para confirmação serológica e molecular dos casos suspeitos;
- Dificuldades para sequenciar completamente o gene E.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abreu, R. M., Martin, O. P., Fernandes, A. R., Jarov, A., Ermichev, Y., Lastre, M. *et al.* (1985). Epidemia de Febre Dengue por vírus do tipo 3 na cidade de Pemba Moçambique (1984-1985). Instituto Nacional de Saúde, Maputo – Moçambique 1985.
2. Alm, E., Lindegren, G., Falk, K. I., Lagerqvist, N. (2015). One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. *BMC Infect Dis* 2(15), 493.
M
3. Amarasinghe, A., Kuritsky, J. N., Letson, G. W., Margolis, H. S. (2011). Dengue Virus Infection in África. *Emerg Infect Dis* 17(8), 1349-54.
4. Ashburn, P. M. e Craig, C. F. (1907). In: Gubler, D. J. Commentary: Ashburn PM, Craig CF. Experimental investigations regarding the etiology of dengue. *J Infect Dis*, 2004 189(9); 1744-1783.
5. Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Santiago, M. A., Gouvea, A. S., Santana, A. A., Neves-Souza, P. C., *et al.* (2001). Characterization of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* 204(4), 494-507.
6. Azeredo, E. L., Kubelka, C. F., Albuquerque, L. M., Barbosa, L. S., Damasco, P. V., Avila, C. A. *et al.*, (2010). Tissue factor expression on monocytes from patients with severe dengue fever. *Blood cells Mol Dis* 45, 334-5.
7. Basu, A., Chaturvedi, U. C. (2008). Vascular endothelium: The battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53(3), 287-99.

8. Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., *et al.* (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446), 504-7.
9. Brinkworth, R. I., Fairlie, D. P., Leung, D., Young, P.R. (1999). Hoology modelo of the dengue 2 virus NS3 protease: putative interactions with both substrate and NS2B cofactor. *J Gen Virol* 80(5), 1167-77.
10. Brinton, M. Replication of flavivirus. In: Schlesinger, S., Schlesinger, M. editors. The Togaviridae and Flaviviridae. New York: *Plenum Press*: 1986. p. 327-65.
11. Carey, D. E., Causey, O. R., Reddy, S. Cooke, A. R. (1971). Dengue viruses from febrile patients in Nigeria, 1964-68. *Lancet* 1, 105-106.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue Homepage. 2014 Junho 9.
13. Centers for Disease Control and Prevention (2016). Memorandum: Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories. Disponível em: <http://www.cdc.gov/zika/pdfs/denvchikvzikk-testing-algorithm.pdf>. Acessado em: Junho de 2017.
14. Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* 44, 649-88.
15. Chawla, T., Chan, K. R., Zhang, S. L., Tan, H. C., Lim, A. P. C., Hanson, B. J., *et al.* (2013). Dengue virus neutralization in cells expressing Fc Gamma Receptors. *PLoS One* 8, e65231.
16. Chen, R., Vasilakis, N. (2011). Dengue — quo tu et quo vadis? *Viruses* 3(9), 1562-608.

17. Chen, L. H. e Wilson, M. E. (2005). Non-vector transmission of and other mosquito-borne flaviviruses. *WHO, Dengue Bulletin*, 29.
18. Christie, J. (1872). Remarks on "kidinga pepo": a peculiar form of exanthematous disease. *Br Med J* 1, 577-79.
19. Domingo, C., Niedrig, M., Gascón, J., Palacios, G., Reyes, N., Malo, M. J., *et al.* (2011). Molecular Surveillance of Circulating Dengue Genotypes through European Travelers. *Journal of Travel Medicine* 18(3), 183-90.
20. Fagbami, A. H., Monath, T. P., Fabiyi, A. (1977). Dengue virus infection in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71, 60-65.
21. Faria, N. R., Nogueira, R. M., de Filippis, A. M., Simões, J. B., Nogueira, F. B., Lima, M., dos Santos, F. B. (2013). Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 7(3), 2095.
22. Figueiredo, L. T. M. (1999). Vacinas contra o dengue. *Medicina, Ribeirão Preto* 32, 21-5.
23. Higa, Y., Abílio, A. P., Futami, K., Lázaro, M. A. F., Minakawa, N., Gudo, E. S. (2015). Abundant *Aedes (Stegomyia) aegypti aegypti* mosquitoes in the 2014 dengue outbreak area of Mozambique. *Trop Med Health* 43(2), 107-9.
24. Gagnon, S. J., Ennis, F. A., Rothman, A. L., (1999). Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol* 73, 3623-9.

25. Gonçalves, A. P., Escalante, A. A., Pujol, F. H., Ludert, J. E., Tovar, D., Salas, R. A., *et al.* (2002). Diversity and evolution of the envelope gene of the dengue virus type 1. *Virology* 303(1), 110-119.
26. Gubler, D. J., Sather, G. E., Kuno, G., Cabral, J. R. (1986). Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 35(6),1280-4.
27. Gubler, D. J. (1988). Dengue. In Monath, T. P. The arboviruses: Epidemiology and ecology, CRC Press, Boca Raton. p. 223-60.
28. Gubler, D. J., Clark, G. G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: The emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1(2), 55-7.
29. Gubler, D. J. Dengue and hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler, D. J., Kuno, G. editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. London: Cab. International; 1997. p. 1-21.
30. Gubler, D. J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11(3), 489-96.
31. Gubler, D. J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health , social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10, 100-103.
32. Gubler, D. J. (2011). Dengue urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21st century. *Trop Med Health* 39(4), 3-11.
33. Gubler, D. J., Ooi, E. E., Vasudevan, S., Farrar, J. editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. 2nd ed. India. p.6-8.

34. Guirakhoo, F., Zhang, Z., Myers, G., Johnson, B. W., Pugachev, K., Nichols, R., et al. (2004). A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/ viscerotropism for monkeys. *J Virol* 78(18), 9998-10008.
35. Guzmán, M. G., Kourí, G. (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2(1), 33-42.
36. Guzmán, M. G., Garcia, G., Kourí, G. (2006). Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities. *Rev Panam Salud Publica* 19(3), 204-15.
37. Guzmán, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., et al. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8(12), S7-S16.
38. Halstead, S. B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239(4839), 476-81.
39. Halstead, S. B. (2007). Dengue. *Lancet* 370, 1644-52.
40. Halstead, S. B. (2008) Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 53, 273-91.
41. Halstead, S. B. (2012). Controversies in dengue pathogenesis. *Paed Inter Child Health* 32(1), 5-9.
42. Henchal, E. A., Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3(4), 376-96.
43. Herrero, L. J., Zakhary, A., Gahan, M. E., Nelson, M. A., Herring, B. L., Hapel, A. J. et al. (2013). Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol Ther* 137(2), 266-82.

44. Higa, Y., Abilio, A. P., Futami, K., Lazaro, M. A., F., Minakawa, N., Gudo, E. S. (2015). Abundant *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitoes in the 2014 dengue outbreak area of Mozambique. *Trop Med Health* 43(2), 107-109.
45. Instituto Nacional de Estatística (2013). Disponível em: WWW.ine.gov.mz.
46. Jessie, K., Fong, M. Y., Devis, S., Lam, S. K., Wong, K. T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and situ hybridization. *J Infect Dis* 189(8), 1411-8.
47. Jiang, L., Wu, X., Wu, Y., Bai, Z., Jing, Q., Luo, L., *et al.* (2013). Molecular epidemiological and virological study of dengue virus infections in Guangzhou, China, during 2001-2010. *Virology* 10(4).
48. Johnson, B. K., Musoke, S., Ocheng, D., Gichogo, A., Rees, P. H. (1982). Dengue-2 virus in Kenya. *Lancet* 320(8291), 208-9.
49. Kanesa-athan, N., Iacono-Connors, L., Magill, A., Smoak, B., Vaughn, D., Dubois, D., Burrous, J., Hoke, C. (1994). Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia. *Lancet* 343(8898), 678.
50. Khromykh, A. A. e Westaway, E. G. (1997). Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. 71, 1497-1505.
51. Konishi, E., Kuno, G. (2013). In memoriam: Susumo Hotta (1918-2011). *Emerg Infect Dis* 19(5), 843-4.
52. Kourí, G., Guzmán, M. G., Bravo, J. (1986). Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bull Pan Am Health Organ* 20(1), 24-30.

53. Kumaria, R. (2010). Correlation of disease spectrum among four dengue serotypes: a five years hospital based study from India. *Braz J Infect Dis* 14(2), 141-6.
54. Kümmerer, B. M. e Rice, C. M. (2002). Mutations in the yellow fever vírus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 76(10), 4773-4784.
55. Kurane, I., Meager, A., Ennis, F. A. (1989). Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype cross-reactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. *J Exp Med* 170, 763-75.
56. Kurane, I. (2007). Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 30, 329-340.
57. Kyle, J., Harris, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* 62, 71-92.
58. Lanciotti, R. S., Charles, Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G-J., Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin Microbiol* 30(3), 545-51.
59. Lewis, J.....(1993). Phylogenetic relationship of dengue-2 viruses. *Virology* 197(1), 216-24.
60. Lindenbach, B. D. e Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59, 23-61.

61. Lindenbach, B. D., Thiel, H-J., Rice, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M., Howley, P. M. editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007. p. 1101-33.
62. Liu-Helmersson, J., Quam, M., Wilder-Smith, A., Stenlund, H., Ebi, K., Massad, E., Rocklöv, J. (2016). Climate Change and Aedes Vectors: 21st Century Projections for Dengue Transmission in Europe. *EBio Medicine* 7, 267-77.
63. Massangaie, M., Pinto, G., Padama, F., Chambe, G., Da Silva, M., Mate, I. *et al.* (2016). Clinical and epidemiological characterization of the first recognized outbreak of dengue virus- type 2 in Mozambique, 2014. *Am J Trop Med Hyg* 94(2), 413-16.
64. Messina, J. P., Brady O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D.M., Duda, K. A., *et al.*, (2014). Global Spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* 22, 138-146.
65. Miller, S., Romero-Brey, I., Bartenschlager, R. The dengue virus replication complex. In: Hanley, K. A, Weaver, S. C. editors. *Frontiers in dengue virus research*. 1st ed. Caister Academic Press; 2010. p. 35-53.
66. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S. C. (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427(6972), 313-9.
67. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flaviviruses life cycle. *Nature Rev Microbiol* 3, 13-22.
68. NICD-NHLS. (2014). Dengue fever. *Communicable Disease Cominiqué*. 13(4).
69. Nogueira, F. B., Nogueira, R. M., Faria, N. R., Simões, J. B., Nunes, P. C., Fillippis, A. M., Santos, F. B. (2015). Insights of the genetic diversity of DENV-1

detected in Brasil in 25 years: Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. *Infect Genet Evol* 34, 126-136.

70. Pan American Health Organization. (1990). Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull* 11(2), 7-9.

71. Peeling, R. W., Artsob, H., Pelegriño, J. L., Buchy, P., Cardoso, M. J., Devi, S., et al. (2010). Evaluation of diagnostics tests: Dengue. *Nat Rev Microbiol* 8(12), 30-8.

72. Pierson, T., Diamond, M., 2013. Flaviviruses. In: Knipe, D., Howley, P. (Eds.), *Fields Virology*, 6ª ed Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 747–794.

73. Pontes, R. J. S. e Ruffino-Neto, A. (1994). Dengue in urban locality of Southeaster, Brasil: epidemiological aspects. *Rev Saúde Pública* 28(3), 218-27.

74. Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L., Strauss, J. H. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229, 726-33.

75. Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution and dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174(2), 479-93.

76. Rico-Hesse, R. (2009). Dengue virus markers of virulence and pathogenicity. *Future Virol* 4(6), 581.

77. Rigau-Pérez, J. G. (1998). The early use of break-bone fever (quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in spanish. *Am J Trop Med Hyg* 59(2), 272-4.

78. Robin, Y., Cornet, M., Heme, G., Le Gonidec, G. (1980). Isolement du virus de la dengue au Senegal. *Ann Virol (Institut Pasteur)* 131, 149-154.

79. Rosen, L., Rozeboom, L. E., Sweet, B. H., Sabin, A. B. (1954). The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am J Trop Med Hyg* 3, 378-82.
80. Rosen, L. (1977). The emperor's new clothes revised, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 26(3), 337-43.
81. Ross, T. M. (2010). Dengue virus. *Clin Lab Med* 30, 149-160.
82. Rothman, A. L., Ennis, F. A. (1999). Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257(1), 1-6.
83. Rudnick, A. (1965). Studies of the ecology of dengue in Malaysia. *J Med Entomol* 2, 203-208.
84. Sabin, A. B. (1952). Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1(1), 30-50.
85. Sang, R. C. Dengue in Africa. In: Report of the scientific working group meeting on dengue. Geneva, October 1-5, 2006.
86. Simmons, M., Porter, K. R., Hayes, C. G., Vaughn, D. W., Putnak, R. (2006). Characterization of antibody responses to combinations of a dengue -virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in rhesus macaques. *J Virol* 80(19), 9577-85.
87. Simmons, C. P., Farrar, J. J., Chau, N. V. V., Wills, B. (2012). Dengue. *N Engl J Med* 366(15), 1423-32.
88. Teixeira, M. G., Barreto, M. L., Guerra, Z. (1999). Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. *Informe Epidemiológico de SUS* 8(4), 5-33.

89. Teoh, B. T., Sam, S. S., Tan, K. K., Danlami, M. B., Shu, M. H., Johari, J., *et al.* (2015). Early detection of dengue vírus by use of reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *J Clin Microbiol* 53(3), 830-7.
90. Trent, D. W., Grant, J. A., Rosen, L., Monath, T. P. (1983). Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology* 128, 271-84.
91. Twiddy, S. S., Farrar, J. J., Chau, N. V. V., Wills, B., Gould, E. A., Gritsun, T., *et al.* (2002). Phylogenetic relationships and differential selection pressure among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 298(1), 63-72.
92. Vairo, F., Mboera, L. E. G., Nardo, P., Oriyo, S. M., Rumisha, S. F., Colavita, F., *et al.*, (2016). Clinical, Virologic and epidemiologic characteristics of dengue outbreak, Dar es Salaam, Tanzania, 2014. *Emerg Infect Dis* 22(5), 895-99.
93. Vasilakis, N., Holmes, E. C., Fokam, E. B., Faye, O., Diallo, M., Sall, A. A., Weaver, S. C. (2007). Evolutionary process among sylvatic Dengue-2 , viruses. *J Virol* 81, 9591-9595.
94. Vasilakis, N., Weaver, S. C. (2008). The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res.* 72, 1-76.
95. Vasilakis, N. e Weaver, S. C. (2017). Flavivirus transmission focusing on Zika. *Current Opinion in Virology* 22, 30–35.
96. Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D. T., Watowich, S. J., Gubler, D. J., *et al.* (2000). Evolutionary relationships of endemic/ epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 74(7), 3227-34.

97. Weaver, S. C., Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 9(4), 523-40.
98. Weaver, S. C., Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research* 85(2), 328-45.
99. Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K., Walther, P., *et al.* (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5(4), 365-75.
100. Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S., Horzinek, M. C., Igarashi, A., Kääriäinen, L., *et al.* (1985). Flaviviridae. *Intervirology* 24(4), 183-92.
Westaway, E. G., Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A. (2003). Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *Adv Virus Res* 59, 99-140.
101. Whitehorn, J., Simmons, C. P. (2011). The pathogenesis of dengue. *Vaccine* 29(42), 7221-8.
102. Wills, B. A., Oragui, E. E., Stephens, A. C., Daramola, O. A., Dung, N. M., Loan, H. T. (2002). Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: Serial investigation in 167 vietnamese children with dengue shock syndrome. *Clin Infect Dis* 35, 277-85.
103. World Health Organization. (1967). Arboviruses and Human Disease. *Report of a WHO Scientific Group*, 369.
104. World Health Organization. (1976). Dengue hemorrhagic fever in the Democratic Republic of Vietnam. *Dengue Newsl. SE Asian W. Pac. Regions* 2, 1-6.

105. World Health Organization. (2007). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; 2007. P. 50-2.
106. World Health Organization. (2009a). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New ed. Geneva: World Health Organization.
107. World Health Organization. (2009b). Dengue in Africa: Emergence of DENV-3, Côte d'Ivoire, 2008. *Weekly Epidemiol Rec.* 84, 85-8.
108. World Health Organization. (2014). International Travel and Health. *Map Production.*
109. World Health Organization. (2015a). Impact of Dengue. Global Alert and Response.
110. World Health Organization. (2015b). Dengue fever outbreak in Mozambique and Tanzania (Situation as of 14 May 2014).
111. World Health Organization. Dengue and severe dengue. 2015 Feb; 177.
112. World Health Organization, 2017. Disponível em: www.WHO.int/denguecontrol/epidemiology/en/. Acessado em Maio de 2017.
113. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>, 2016: Acessado em Maio de 2017.
114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>: Acessado em Outubro de 2015.